



Avaliação da Ecotoxicidade do Ibuprofeno e seus Metabolitos usando Microalgas

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Controlo de Qualidade na Área de Especialização em Ambiente

Orientador: Professora Doutora Sónia Adriana Ribeiro Figueiredo

Coorientadores: Professora Doutora Cristina Fernandes Delerue-Matos
Professora Doutora Maria Beatriz Prior Pinto Oliveira

Trabalho realizado no Grupo de Reação e Análises Químicas (GRAQ) do Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP)

Liliana Andreia Gonçalves da Costa Alves
Licenciada em Engenharia Química pela Universidade de Coimbra

Setembro 2014

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Agradecimentos

A elaboração desta dissertação e finalização do mestrado não teria sido possível sem a contribuição de várias pessoas a quem desejo agradecer.

À Professora Doutora Sónia Adriana Ribeiro Figueiredo, minha orientadora, pela permanente disponibilidade demonstrada, dedicada colaboração, esclarecimentos, correções, bem como valiosas sugestões transmitidas.

À Professora Doutora Cristina Fernandes Delerue-Matos, minha coorientadora, pelo acolhimento no GRAQ, pela orientação científica e por todas as palavras de incentivo.

À Professora Doutora Maria Beatriz Prior Pinto Oliveira, minha coorientadora, pela boa disposição e pelo incansável auxílio na procura de um tema de acordo com o pretendido.

Aos meus pais e à minha irmã pelo constante incentivo, força transmitida e compreensão nas ausências repetidas durante este período. Ao meu sobrinho por todas as brincadeiras e momentos de descontração.

Ao Sérgio pela paciência, compreensão, e apoio incondicional durante toda esta etapa.

Aos meus colegas e amigos de trabalho do CEMUP, pelo espírito de equipa e colaboração durante este percurso.

Aos meus colegas do Mestrado em Controlo de Qualidade, pelo companheirismo e ajuda mútua.

Aos membros do GRAQ, por me terem recebido com simpatia e prestado auxílio sempre que precisei durante a realização do trabalho experimental.

À Engenheira Paula Paíga e à Doutora Lúcia Santos, pela preciosa ajuda na análise cromatográfica e por todas as elucidações.

À Doutora Ana Carvalho pelo fornecimento da cultura *stock* de alga *Chlorella vulgaris*.

À minha família e aos meus amigos.

A todos um muito obrigada!

Resumo

Este trabalho teve como objetivo fulcral avaliar a ecotoxicidade do ibuprofeno e dos seus metabolitos, carboxi-ibuprofeno e 2-hidroxi-ibuprofeno, utilizando microalgas. A escolha desta substância ativa deveu-se ao facto de ser largamente consumida, e por possuir uma forte presença no meio hídrico pois os tratamentos convencionais não permitem a sua completa remoção.

De modo a permitir comparar a sensibilidade das algas utilizaram-se duas espécies, tendo-se optado pela *Pseudokirchneriella subcapitata* por ser um organismo padrão em ecotoxicidade, e pela *Chlorella vulgaris* por ser muito sensível a substâncias tóxicas, facilmente cultivada em laboratório e representativa das algas presentes na natureza, sendo encontrada em água doce e salgada, e no solo.

Os ensaios de ecotoxicidade crónica consistiram em expor culturas de algas, num sistema estático sem renovação, a diferentes concentrações das substâncias em estudo, durante 72 ± 2 horas. O teste foi realizado à temperatura ambiente e com iluminação fluorescente uniforme contínua do tipo branca fria. Para avaliar as condições utilizadas nos ensaios foi realizado inicialmente um teste com uma substância inibidora de referência, o dicromato de potássio. A concentração de substância avaliada nos ensaios foi adaptada à sensibilidade da alga, tendo-se testado as seguintes gamas: dicromato de potássio – 0,25 a 4 mg/L para a *Pseudokirchneriella subcapitata* e 0,0625 a 1 mg/L para a *Chlorella vulgaris*; ibuprofeno – 4 a 36 mg/L para ambas as algas; metabolitos – 1 a 8 mg/L para a *Pseudokirchneriella subcapitata* e 0,5 a 8 mg/L para a *Chlorella vulgaris*.

O parâmetro avaliado neste estudo foi a inibição do crescimento algal, cuja estimativa foi realizada através da medida da absorvância a 440 nm, e posteriormente convertida em densidade celular através da curva de calibração obtida. O crescimento algal foi calculado pela diferença entre a densidade celular final e inicial, e a inibição do crescimento estimada pela redução de algas no ensaio com substância relativamente à cultura de controlo. Para garantir a validade do teste avaliou-se o pH e a concentração de substância-teste no princípio e no final do ensaio.

Os resultados de ecotoxicidade obtidos foram analisados estatisticamente, tendo-se obtido no ensaio de ibuprofeno com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* um valor estimado de CE_{50} de 11,39 mg/L, e no ensaio com a espécie *Chlorella vulgaris* um valor de CE_{10} e de CEO de 12,88 e 3,60 mg/L, respetivamente. Os resultados obtidos indicaram que o ibuprofeno é mais tóxico para a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* do que para a espécie *Chlorella vulgaris*, permitindo inferir que os níveis de toxicidade de uma espécie não podem ser extrapolados para outras.

Para o carboxi-ibuprofeno obteve-se uma CE_{25} estimada de 3,78 mg/L e uma CE_{10} estimada de 1,70 mg/L com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, e uma CE_{10} de 1,03 mg/L e uma CEO de 0,70 mg/L para a espécie *Chlorella vulgaris*. Relativamente ao metabolito 2-hidroxi-ibuprofeno, obteve-se uma CE_{25} estimada de 6,72 mg/L para a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, e uma CE_{10} de 1,94 mg/L para a espécie *Chlorella vulgaris*. As concentrações de metabolitos testadas não foram prejudiciais para o crescimento das algas avaliadas, mas concentrações mais elevadas poderão ter efeitos nocivos.

Palavras-chave: ensaios de ecotoxicidade; algas; ibuprofeno; metabolitos.

Abstract

The main objective of this work was to evaluate the ecotoxicity of the ibuprofen and its metabolites, carboxy-ibuprofen and 2-hydroxy-ibuprofen, using microalgae. The choice of this active substance was due to the fact that it is widely consumed, and has a strong presence in the aquatic environment because the conventional treatments do not remove it completely.

In order to compare the sensibility of the algae two different species were used, the *Pseudokirchneriella subcapitata* because it is a standard organism in ecotoxicity and the *Chlorella vulgaris* due to its good sensitivity to toxicants, easy culture in laboratory and because its representative of the algae present in nature, being found in freshwater, saltwater and soil.

The chronic ecotoxicity assays consisted in exposing algae culture, in a static non-renewal system, to different concentrations of substance in study, for 72 ± 2 hours. The test was performed at room temperature and with uniform continuous fluorescent illumination type cool white. In order evaluate the conditions used in assays it was initially carried out a test with an inhibitory reference substance, potassium dichromate. The concentration of substances tested in the assays was adapted to the sensibility of the alga, having been tested the following ranges: potassium dichromate – 0.25 to 4 mg/L for the *Pseudokirchneriella subcapitata* and 0.0625 to 1 mg/L for the *Chlorella vulgaris*; ibuprofen – 4 to 36 mg/L for both algae; metabolites – 1 to 8 mg/L for the *Pseudokirchneriella subcapitata* and 0.5 to 8 mg/L for the *Chlorella vulgaris*.

The parameter evaluated in this study was the inhibition of algae growth, which was measured by absorbance at 440 nm and correlated with cell density through a linear correlation. The algae growth was calculated by difference between final and initial absorbance, and the growth inhibition of algae estimated by reduction of the algae in the assay with substance. To ensure the validity of each test pH and concentration of the substance tested were measured in the beginning and at the end of the test.

The ecotoxicity results were statistically analyzed, having been obtained for the ibuprofen test with the alga *Pseudokirchneriella subcapitata* an estimated value of CE_{50} of 11.39 mg/L, and in assay with the specie *Chlorella vulgaris* a value of CE_{10} and of CEO of 12.88 and 3.60 mg/L, respectively. The results obtained indicated that ibuprofen is more toxic for the alga *Pseudokirchneriella subcapitata* than for the *Chlorella vulgaris*, leading to the observation that toxicity levels cannot be extrapolated from one specie to another.

For the carboxy-ibuprofen it was obtained an estimated CE_{25} of 3.78 mg/L and an estimated CE_{10} of 1.70 mg/L with the alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, and a CE_{10} of 1.03 mg/L and a CEO of 0.70 mg/L for the specie *Chlorella vulgaris*. Relative to the

metabolite 2-hydroxy-ibuprofen, it was obtained an estimated CE₂₅ of 6.72 mg/L with the alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, and a CE₁₀ of 1.94 mg/L for the specie *Chlorella vulgaris*. The concentrations tested not were harmful for growth of alga evaluated, but higher concentrations may be.

Keywords: ecotoxicity studies; algae; ibuprofen, metabolites.

Índice

	Página
Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	v
Lista de siglas e símbolos	xiv
1. Introdução	16
2. Legislação e caracterização da água	18
2.1. Diretiva-Quadro da Água (DQA)	19
2.2. Parâmetros de caracterização da água e sua importância	23
3. Ecotoxicidade	26
3.1. Fatores que influenciam a toxicidade	27
3.2. Parâmetros de avaliação da toxicidade	28
3.3. Efeito de interação	30
3.4. Classificação dos testes de toxicidade	31
3.4.1. Classificação dos testes de toxicidade de acordo com a exposição dos organismos-teste	31
3.4.1.1. Testes de toxicidade aguda	31
3.4.1.2. Testes de toxicidade crônica	32
3.4.2. Classificação dos testes de toxicidade de acordo com a renovação das soluções-teste	32
3.4.2.1. Testes estáticos	32
3.4.2.2. Testes semi-estáticos	33
3.4.2.3. Testes dinâmicos	34
3.5. Organismos-teste	34
3.5.1. Bactérias	36
3.5.2. Algas e plantas aquáticas	37
3.5.3. Crustáceos	39
3.5.4. Peixes	42
3.6. Avaliação e identificação da toxicidade	43
4. Metodologias de ensaio	44
4.1. Bioensaios com bactérias	46
4.2. Bioensaios com algas	47

4.3. Bioensaios com crustáceos	50
4.4. Bioensaios com peixes	51
5. Ecotoxicidade de produtos farmacêuticos	52
5.1. Enquadramento legal	53
5.2. Ibuprofeno	54
6. Materiais e métodos	62
6.1. Reagentes e solventes	62
6.2. Organismos-teste	63
6.3. Meio nutriente	64
6.4. Substância de referência	65
6.5. Substâncias de ensaio	66
6.6. Procedimento experimental	66
6.7. Parâmetros de avaliação	68
6.7.1. Inibição do crescimento de algas	68
6.7.2. pH	69
6.7.3. Concentração de substância de ensaio	70
6.8. Análise de dados	72
7. Resultados e discussão	75
7.1. Curvas de calibração	76
7.1.1. Curvas de calibração absorvância <i>versus</i> densidade celular	76
7.1.2. Curvas de calibração absorvância <i>versus</i> concentração de alga	77
7.2. Testes de inibição	78
7.2.1. Inibição do crescimento algal para o dicromato de potássio	78
7.2.2. Inibição do crescimento algal para o ibuprofeno	80
7.2.3. Inibição do crescimento algal para o carboxi-ibuprofeno	81
7.2.4. Inibição do crescimento algal para o 2-hidroxi-ibuprofeno	82
7.3. Análise de dados dos testes de ecotoxicidade	83
7.3.1. Toxicidade do dicromato de potássio	83
7.3.2. Toxicidade do ibuprofeno	84
7.3.3. Toxicidade do carboxi-ibuprofeno	85
7.3.4. Toxicidade do 2-hidroxi-ibuprofeno	85
8. Conclusão e sugestões para trabalho futuro	86

Referências bibliográficas	88
Anexos	106
A. Condições experimentais testadas	106
A.1. Construção da reta de calibração	106
A.2. Ensaio de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$)	106
A.3. Ensaio de ibuprofeno (IBU).....	107
A.4. Ensaio de metabolitos	107
B. Ensaio de ecotoxicidade	108
B.1. Ensaio com a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	108
B.1.1. Ensaio de dicromato de potássio	108
B.1.2. Ensaio de ibuprofeno	108
B.1.3. Ensaio de carboxi-ibuprofeno	108
B.1.4. Ensaio de 2-hidroxi-ibuprofeno	109
B.2. Ensaio com a alga <i>Chlorella vulgaris</i>	109
B.2.1. Ensaio de dicromato de potássio	109
B.2.2. Ensaio de ibuprofeno	109
B.2.3. Ensaio de carboxi-ibuprofeno	110
B.2.4. Ensaio de 2-hidroxi-ibuprofeno	110
C. Resultados experimentais	111
C.1. Ensaio com a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	111
C.2. Ensaio com a alga <i>Chlorella vulgaris</i>	112
C.3. Exemplo de um cromatograma	115
D. Exemplo da análise de dados do teste de dicromato de potássio com a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	116
D.1. Resposta do crescimento algal em função da concentração de substância de referência	116
D.2. Teste de Shapiro-Wilk	116
D.3. Teste de Bartlett	117
D.4. Teste de Dunnett	118
E. Resultados da análise dos dados de ecotoxicidade	119

Índice de Figuras

Figura 3.1 – Representação da relação dose-resposta tipicamente obtida em testes de ecotoxicidade	30
Figura 3.2 – Bactéria marinha luminescente <i>Vibrio fischeri</i>	36
Figura 3.3 – Algas: A) <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> ; B) <i>Scenedesmus subspicatus</i> .	38
Figura 3.4 – Planta <i>Lemna minor</i>	39
Figura 3.5 – Crustáceo de água doce <i>Daphnia magna</i>	40
Figura 3.6 – Crustáceo marinho <i>Artemia salina</i>	41
Figura 3.7 – Peixes: A) <i>Danio rerio</i> ; B) <i>Oncorhynchus mykiss</i>	42
Figura 5.1 – Estrutura molecular do ibuprofeno	54
Figura 6.1 – Culturas de alga: A) <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> ; B) <i>Chlorella vulgaris</i>	64
Figura 6.2 – Espectrofotômetro UV/visível (Jenway, modelo 6405)	68
Figura 6.3 – Câmara de contagem (Blaubrand, modelo Neubauer improved)	69
Figura 6.4 – Elétrodo de vidro combinado conectado a um decimilivoltímetro (Crison®, modelo pH meter GLP 22)	69
Figura 6.5 – Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de fluorescência (Prominence Shimadzu)	70
Figura 7.1 – Curva de calibração absorvância versus densidade celular para a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	76
Figura 7.2 – Curva de calibração absorvância versus densidade celular para a alga <i>Chlorella vulgaris</i>	76
Figura 7.3 – Curva de calibração absorvância versus concentração de alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	77
Figura 7.4 – Curva de calibração absorvância versus concentração de alga <i>Chlorella vulgaris</i>	77
Figura 7.5 – Inibição do crescimento da alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> em função da concentração de dicromato de potássio	79
Figura 7.6 – Inibição do crescimento da alga <i>Chlorella vulgaris</i> em função da concentração de dicromato de potássio	79
Figura 7.7 – Inibição do crescimento da alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> em função da concentração de ibuprofeno	80
Figura 7.8 – Inibição do crescimento da alga <i>Chlorella vulgaris</i> em função da concentração de ibuprofeno	80
Figura 7.9 – Inibição do crescimento da alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> em função da concentração de carboxi-ibuprofeno	81

Figura 7.10 – Inibição do crescimento da alga <i>Chlorella vulgaris</i> em função da concentração de carboxi-ibuprofeno	81
Figura 7.11 – Inibição do crescimento da alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> em função da concentração de 2-hidroxi-ibuprofeno	82
Figura 7.12 – Inibição do crescimento da alga <i>Chlorella vulgaris</i> em função da concentração de 2-hidroxi-ibuprofeno	82
Figura B.1 – Ensaio de dicromato de potássio com a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> : A) Início; B) Fim	108
Figura B.2 – Ensaio de ibuprofeno com a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> : A) Início; B) Fim	108
Figura B.3 – Ensaio de carboxi-ibuprofeno com a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> : A) Início; B) Fim	108
Figura B.4 – Ensaio de 2-hidroxi-ibuprofeno com a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> : A) Início; B) Fim	109
Figura B.5 – Ensaio de dicromato de potássio com a alga <i>Chlorella vulgaris</i> : A) Início; B) Fim	109
Figura B.6 – Ensaio de ibuprofeno com a alga <i>Chlorella vulgaris</i> : A) Início; B) Fim	109
Figura B.7 – Ensaio de carboxi-ibuprofeno com a alga <i>Chlorella vulgaris</i> : A) Início; B) Fim	110
Figura B.8 – Ensaio de 2-hidroxi-ibuprofeno com a alga <i>Chlorella vulgaris</i> : A) Início; B) Fim	110
Figura C.1 – Exemplo de um cromatograma obtido para uma mistura de padrões com concentração individual de 4 mg/L	115

Índice de Tabelas

Tabela 3.1 – Níveis tróficos da pirâmide ecológica, organismos representativos e espécies mais utilizadas nos testes de ecotoxicidade	35
Tabela 5.1 – Propriedades físico-químicas do ibuprofeno	55
Tabela 5.2 – Exemplos de concentrações de ibuprofeno e dos seus metabolitos avaliados em diferentes ambientes aquáticos	57
Tabela 5.3 – Exemplos de avaliação da ecotoxicidade do ibuprofeno	61
Tabela 6.1 – Composição e respetiva concentração nas soluções de reserva	65
Tabela 6.2 – Resumo das condições utilizadas no ensaio de ecotoxicidade	67
Tabela 6.3 – Resumo das condições cromatográficas utilizadas	71
Tabela 7.1 – Coeficientes de correlação e limites de deteção (LD) e de quantificação (LQ) obtidos para as diferentes substâncias	75
Tabela 7.2 – Resultados obtidos na análise dos dados de ecotoxicidade	83
Tabela A.1 – Volumes utilizados nas diluições de alga	106
Tabela A.2 – Volumes utilizados no ensaio de $K_2Cr_2O_7$ com a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	106
Tabela A.3 – Volumes utilizados no ensaio de $K_2Cr_2O_7$ com a alga <i>Chlorella vulgaris</i> ..	106
Tabela A.4 – Volumes utilizados no ensaio de ibuprofeno com as algas <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> e <i>Chlorella vulgaris</i>	107
Tabela A.5 – Volumes utilizados nos ensaios de carboxi-ibuprofeno e 2-hidroxi-ibuprofeno com a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	107
Tabela A.6 – Volumes utilizados nos ensaios de carboxi-ibuprofeno e 2-hidroxi-ibuprofeno com a alga <i>Chlorella vulgaris</i>	107
Tabela C.1 – Resultados obtidos no ensaio de dicromato de potássio com a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	111
Tabela C.2 – Resultados obtidos no ensaio de ibuprofeno com a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	111
Tabela C.3 – Resultados obtidos no ensaio de carboxi-ibuprofeno com a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	112
Tabela C.4 – Resultados obtidos no ensaio de 2-hidroxi-ibuprofeno com a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	112
Tabela C.5 – Resultados obtidos no ensaio de dicromato de potássio com a alga <i>Chlorella vulgaris</i>	113
Tabela C.6 – Resultados obtidos no ensaio de ibuprofeno com a alga <i>Chlorella vulgaris</i>	113

Tabela C.7 – Resultados obtidos no ensaio de carboxi-ibuprofeno com a alga <i>Chlorella vulgaris</i>	114
Tabela C.8 – Resultados obtidos no ensaio de 2-hidroxi-ibuprofeno com a alga <i>Chlorella vulgaris</i>	114
Tabela D.1 – Crescimento algal em função da concentração de substância e respectiva transformação logarítmica	116
Tabela D.2 – Observações centradas para o teste de Shapiro-Wilk e valor de D calculado	116
Tabela D.3 – Observações centradas ordenadas para o Teste de Shapiro-Wilk	116
Tabela D.4 – Coeficientes (a_i) e diferenças ($X^{(n-i+1)}-X^{(i)}$) para o Teste de Shapiro-Wilk e valor de W calculado	117
Tabela D.5 – Valores de t_i calculados	118
Tabela E.1 – Parâmetros obtidos na análise dos dados de ecotoxicidade	119

Lista de siglas e símbolos

ACN – Acetonitrilo

AINE – Anti-inflamatórios não esteróides

AOAC – *Association of Analytical Communities*

APRH – Associação Portuguesa dos Recursos Hídricos

ASTM – *American Society for Testing and Materials*

ATPase – Adenosina trifosfatase

CBO₅ – Carência bioquímica de oxigénio ao fim de 5 dias

CCDR – Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional

CE₁₀ – Concentração efetiva que causa inibição a 10% da população dos organismos

CE₂₅ – Concentração efetiva que causa inibição a 25% da população dos organismos

CE₅₀ – Concentração efetiva que causa inibição a 50% da população dos organismos

CENO – Concentração de efeito não observado

CEO – Concentração de efeito observado

CL₅₀ – Concentração letal para 50% da população dos organismos

CNA – Conselho Nacional da Água

COX – Cicloxigenase

CQO – Carência química de oxigénio

CRH – Conselho de região hidrográfica

DIN – *Deutsches Institut für Normung*

DQA – Diretiva-Quadro da Água

EMA – *European Medicines Agency*

EPA ou USEPA – *United States Environmental Protection Agency*

ETAR – Estação de tratamento de águas residuais

EUA – Estados Unidos da América

FDA – *Food and Drug Administration*

INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde

ISO – *International Standard Organization*

LC-FLD – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de fluorescência

LD – Limite de deteção

$\log K_d$ – Coeficiente de distribuição sólido-água

$\log K_{oc}$ – Coeficiente de adsorção baseado no carbono orgânico

$\log K_{ow}$ – Coeficiente de partição octanol-água

LQ – Limite de quantificação

OD – Oxigénio dissolvido

OECD – *Organization for Economic Cooperation and Development*

OMS – Organização Mundial de Saúde

ONGA – Organização Não-Governamental de Ambiente

PGRH – Plano de Gestão de Região Hidrográfica

pK_a – Constante de dissociação

TIE – *Toxicity identification evaluation*

UE – União Europeia

UT_a – Unidades tóxicas agudas

UT_c – Unidades tóxicas crónicas

VLE – Valor limite de emissão

VMA – Valor máximo admissível

VMR – Valor máximo recomendado

1. Introdução

A água é uma substância essencial à vida na terra, desempenhando um papel fundamental na sobrevivência de todos os seres vivos. Esta fonte insubstituível para além de ser consumida diretamente pelos seres humanos, funciona como suporte para a manutenção dos ecossistemas aquáticos. É também um fator indispensável para o desenvolvimento socioeconómico de um país, sendo crucial em diversas atividades, tais como saneamento, utilizações domésticas, indústria, agricultura, pesca e produção de eletricidade ^[1-3].

A maior parte da água existente no planeta terra é salgada (96,5%), correspondendo a água doce a uma pequena fração (3,5%), da qual apenas cerca de 1% está disponível para uso humano ^[1,4].

Numa perspetiva global, a água é uma fonte renovável. Contudo, o facto de esta substância possuir elevada capacidade para dissolver substâncias altera as suas características, perdendo qualidade e tornando-se poluída. O crescimento da população mundial, juntamente com o desenvolvimento económico e industrial, conduziu ao aumento gradual da utilização da água, e conseqüentemente, à degradação da sua qualidade. A água potável é um recurso natural imprescindível mas limitado, tendo-se a sua escassez tornado uma preocupação geral. Para contornar esta situação, a qualidade da água deve ser preservada, devendo a sua utilização ser gerida de uma forma ponderada e equilibrada ^[1,2,5].

Os cursos de água continentais correspondem aos ecossistemas mais alterados do planeta, tendo nas últimas décadas a biodiversidade destes decrescido drasticamente. A amplificação genérica da poluição da água doce representa atualmente o principal problema ambiental no mundo. A contaminação depende da concentração e das propriedades físico-químicas das substâncias rejeitadas, dos produtos resultantes, do tipo de descarga (pontual ou difusa), e das propriedades do ecossistema (capacidade tampão, concentração de matéria orgânica dissolvida e localização) ^[6-8].

Os derrames acidentais e a descarga nos ecossistemas de efluentes domésticos e industriais, frequentemente com tratamento incompleto, representam as principais fontes de poluição pontual da água. No que diz respeito às fontes de poluição difusa, estas correspondem à introdução de substâncias nos recursos hídricos, como por exemplo, pesticidas e fármacos. O controlo das descargas difusas será mais complexo, devido a estas variarem no tempo, espaço e percurso ^[3,7-9].

Os contaminantes, após atingirem o ambiente são sujeitos a um conjunto de processos que podem afetar o seu destino e comportamento, podendo as substâncias potencialmente tóxicas ser degradadas. Não obstante, a maioria das substâncias tóxicas

é resistente aos processos de tratamento e persistem no ambiente durante longos períodos de tempo, podendo a descarga contínua no ambiente levar à sua acumulação e promover a toxicidade ^[8].

O excesso de nutrientes introduzidos no ecossistema pode levar à eliminação dos organismos mais sensíveis, podendo os mais tolerantes tirar partido da eliminação dos competidores e predadores, e usufruir do incremento de alimento disponível sob a forma de matéria orgânica para se desenvolverem, atingindo um aumento excessivo de algas que se designa por eutrofização. Ora, ocorrerá um decréscimo do oxigénio dissolvido (OD), que conduzirá à morte e à decomposição de muitos organismos, e que deteriorará naturalmente a qualidade da água, alterando profundamente o ecossistema ^[3,10].

As atividades agrícolas e industriais representam as fontes mais comuns de degradação da qualidade da água nos países europeus. A presença de agentes tóxicos no ambiente aquático tem crescido drasticamente ao longo das últimas décadas, sendo a sua importância proporcional à complexidade das transformações que provocam no meio ambiente ^[9,11].

A qualidade dos recursos hídricos e a conservação dos ecossistemas são essenciais para uma estratégia sustentável, pelo que têm vindo a ser feitos esforços ao longo dos anos no sentido de reduzir as substâncias tóxicas, ou até mesmo de as eliminar.

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a ecotoxicidade do ibuprofeno e dos seus metabolitos, carboxi-ibuprofeno e 2-hidroxi-ibuprofeno, utilizando microalgas. A escolha desta substância ativa deveu-se ao facto de ser largamente consumida, e devido a possuir uma complexa degradabilidade, os tratamentos convencionais não permitem a sua completa remoção, pelo que têm uma forte presença no meio hídrico. Utilizaram-se duas espécies de algas de modo a permitir comparar a sua sensibilidade, tendo-se optado pela *Pseudokirchneriella subcapitata* por ser um organismo padrão em ecotoxicidade, e pela *Chlorella vulgaris* por ser muito sensível a substâncias tóxicas, facilmente cultivada em laboratório e representativa das algas presentes na natureza, sendo encontrada em água doce e salgada, e no solo ^[12-14].

2. Legislação e caracterização da água

A qualidade da água é um aspeto fundamental, pois os níveis de poluição podem inviabilizar a sua potabilidade, e conseqüentemente, a sua utilização para consumo humano. Este atributo define-se pelas características físicas, químicas e microbiológicas que apresenta, as quais variam em função da sua natureza, origem e processos de tratamento utilizados^[15].

A água deve ser sujeita a um rigoroso controlo da qualidade, de acordo com um conjunto de parâmetros cujos objetivos, critérios de avaliação e valores padrão variam de acordo com o seu uso e se encontram estabelecidos em diretivas comunitárias, decretos-lei e normas da qualidade. É de salientar que em Portugal, nas últimas décadas, se tem verificado uma clara melhoria no controlo da qualidade da água para consumo humano, tendo aumentado o número de análises obrigatórias, o que permitiu uma evolução da qualidade claramente positiva^[15].

O Decreto-Lei n.º 236/98, de 1 de agosto pretende resolver os problemas resultantes da incompleta ou incorreta transposição das diretivas comunitárias relativas à qualidade da água, e numa perspetiva de proteção de saúde pública, de gestão integrada dos recursos hídricos e de preservação do ambiente, pretende clarificar as competências das várias entidades intervenientes no domínio da qualidade da água. De forma a melhorar a qualidade da água e proteger conjuntamente a qualidade do meio aquático, da saúde pública e do solo, este decreto-lei estabelece normas, critérios e objetivos de qualidade em função dos seus principais usos: água para consumo humano, para suporte da vida aquícola, banhar e de rega. Este decreto-lei foi retificado pela Declaração de Retificação n.º 22-C/98, tendo sido posteriormente revogado, em 2001, no que diz respeito à qualidade da água para consumo humano. O referido decreto-lei fixa ainda valores limite de emissão (VLE), cujos valores não devem ser excedidos por uma instalação na descarga de águas residuais no meio aquático ou no solo. Os VLE correspondem à massa expressa em unidades específicas para cada parâmetro, à concentração ou ao nível de emissão de determinada substância, podendo ser fixados para determinados grupos, famílias ou categorias de substâncias. O valor máximo admissível (VMA) refere-se ao valor de norma de qualidade que não deverá ser ultrapassado, enquanto o valor máximo recomendado (VMR) corresponde ao valor de norma de qualidade que deve preferencialmente ser respeitado. No Anexo I do supracitado decreto-lei é possível encontrar os VMA e VMR referentes às diferentes classes de tratamento de água doce superficial destinadas à produção de água para consumo humano^[16,17].

A qualidade da água destinada ao consumo humano é estabelecida no Decreto-

-Lei n.º 306/2007, de 27 de agosto, o qual revoga o Decreto-Lei n.º 243/2001, de 5 de setembro, que por sua vez tinha revogado o Decreto-Lei n.º 236/98, de 1 de agosto, mantendo, no entanto, os seus aspetos fundamentais. O referido decreto-lei modificou a lista de parâmetros a realizar e alguns valores paramétricos e abordou o controlo dos pesticidas de uma forma mais racionalizada, tendo como objetivo assegurar o fornecimento de água salubre, limpa e com composição equilibrada, de forma a proteger a saúde humana dos efeitos nocivos resultantes da ingestão de água ^[16,18,19].

Ao nível das águas balneares, o Decreto-Lei n.º 135/2009, de 3 de junho, estabelece o regime de identificação, gestão, monitorização e classificação da qualidade das águas balneares, alterado entretanto pelo Decreto-Lei n.º 113/2012, de 23 de maio. O tratamento das águas residuais urbanas é regulamentado pelo Decreto-Lei n.º 152/97, de 19 de junho, posteriormente alterado pelos Decretos-Lei n.º 348/98, de 9 de novembro, n.º 149/2004, de 22 de junho e n.º 198/2008, de 8 de outubro, nomeadamente no que se refere à qualidade das águas residuais urbanas descarregadas em meios aquáticos sensíveis ^[20-25].

2.1. Diretiva-Quadro da Água (DQA)

Nas últimas décadas, a Europa tem sido sujeita a um aumento do nível de contaminação ambiental, paralelamente à crescente pressão ambiental das atividades humanas. Como estratégia de proteção da quantidade e qualidade da água existente na Europa, têm sido estabelecidas diferentes diretivas comunitárias, as quais têm vindo a sofrer uma evolução gradual ao longo do tempo ^[27].

A necessidade de evolução da legislação comunitária em vigor relativa à proteção das águas, levou a uma revisão global de diplomas legislativos dispersos relativos à água, no sentido de uma gestão integrada e sustentável. Nesta dialética, a Comissão Europeia apresentou uma proposta de diretiva em fevereiro de 1996, que engloba as disposições relevantes referentes à qualidade ecológica das águas, e estabelece a necessidade de uma maior integração dos aspetos qualitativos e quantitativos para uma gestão sustentável dos ecossistemas aquáticos. Após várias negociações foi criada a Diretiva 2000/60/CE, de 23 de outubro, que estabelece um quadro de ação comunitária no domínio da política da água, tendo posteriormente sofrido várias modificações. Esta diretiva é usualmente referida como Diretiva-Quadro da Água (DQA), tendo sido transposta para o ordenamento jurídico nacional pela Lei n.º 58/2005, de 29 de dezembro (Lei da Água), retificada pela Declaração de Retificação n.º 11-A/2006, de 23 de fevereiro, parcialmente revogada pelos Decretos-Lei n.º 245/2009, de 22 de setembro e

n.º 130/2012, de 22 de junho, e ainda alterada pelo Decreto-Lei n.º 60/2012, de 14 de março. A transposição da DQA foi realizada também pelo Decreto-Lei complementar n.º 77/2006, de 30 de março, alterado pelo Decreto-Lei n.º 103/2010, de 24 de setembro. Relativamente às alterações desta diretiva, é possível destacar respetivamente, a Decisão n.º 2455/2001/CE, de 20 de novembro que estabelece a lista das substâncias prioritárias no domínio da política da água, a Diretiva 2006/11/CE, de 15 de fevereiro relativa à poluição causada por determinadas substâncias perigosas lançadas no meio aquático da Comunidade (atualmente parcialmente revogada), a Diretiva 2008/32/CE, de 11 de março que diz respeito às competências de execução atribuídas à Comissão, a Diretiva 2008/105/CE, de 16 de dezembro relativa a normas de qualidade ambiental no domínio da política da água, a Diretiva 2009/31/CE, de 23 de abril relativa ao armazenamento geológico de dióxido de carbono e a Diretiva 2013/39/UE, de 12 de agosto relativa às substâncias prioritárias no domínio da política da água ^[27-41].

Esta diretiva, de caráter vinculativo, é uma das ferramentas mais importantes da legislação ambiental produzida nos últimos anos, a qual transformou o modo de controlo da qualidade da água realizado em todos os Estados-Membros da União Europeia (UE). A DQA estabelece um enquadramento legal, inovador, transparente, eficaz e coerente, baseando-se numa abordagem comum com princípios, objetivos e medidas coordenadas entre si. Relativamente aos principais aspetos introduzidos pela DQA, é possível destacar a abordagem integrada de proteção das águas europeias (águas subterrâneas e águas superficiais – rios, lagos e águas de transição e costeiras) e a determinação de um conjunto de objetivos ambientais a alcançar a longo prazo pelos Estados-Membros da UE, de forma a proteger as massas de água e os ecossistemas aquáticos e terrestres da Comunidade, promovendo a utilização sustentável e salvaguardando futuras utilizações da água. Assim, baseia-se nos princípios do poluidor-pagador e da precaução para corrigir os danos prioritariamente na fonte, definindo que todos têm o dever de prevenir, proteger, melhorar e recuperar todas as massas de água, visando deste modo a melhoria da qualidade do ambiente e a proteção da saúde humana ^[27,42-45].

É de referir, ainda, a estratégia para a eliminação da poluição causada por substâncias perigosas e a elaboração de programas de monitorização do estado da água baseados numa abordagem ecológica, que permitem uma análise coerente e exaustiva em cada região hidrográfica ^[27].

A DQA foca-se em aspetos sociais, ambientais e económicos, que incluem a participação do público (Artigo 14º), o alcance do bom estado ecológico (Anexo V), a recuperação dos custos dos serviços hídricos (Artigo 9º), a proteção das águas subterrâneas (Artigo 17º) e os Planos de Gestão de Região Hidrográfica (PGRH) (Artigo 13º) ^[42,44,45].

No que diz respeito às considerações sociais, a DQA requer que os Estados-Membros da UE se baseiem em ações com participação do público, incluindo informação, consulta e participação ativa, e nos princípios da precaução, da subsidiariedade e da transparência. A participação do público destaca-se como a consideração mais relevante para alcançar o sucesso da DQA, sendo um requisito especialmente importante na elaboração, revisão, e atualização dos PGRH, contribuindo para processos de tomada de decisão mais sustentados, um maior entendimento dos problemas ambientais e uma diminuição de eventuais conflitos por desconhecimento ou falta de informação. Relativamente ao público-alvo, este refere-se a todas as pessoas singulares ou coletivas, que de forma direta ou indireta são afetadas pela implementação dos PGRH, particularmente a administração pública central e local, empresas, instituições de natureza científica, associações não-governamentais, associações locais, quadros técnicos e administrativos, e cidadãos individuais. Os órgãos com papel mais ativo neste processo são o Conselho Nacional da Água (CNA), o Conselho de Região Hidrográfica (CRH), a Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional (CCDR), a Associação Portuguesa dos Recursos Hídricos (APRH), as Organizações Não-Governamentais de Ambiente (ONGA), as Organizações Setoriais (urbano, agricultura, indústria e turismo) e outras Organizações e cidadãos com interesse em matérias relativas à água ^[27;44,45].

O principal objetivo da DQA é garantir a qualidade de todas as massas de água da UE, de forma a melhorar, proteger e evitar a sua deterioração, bem como proteger a biodiversidade dos ecossistemas. Para isso, define metas estritas e ambiciosas para a sua conservação e proteção, de forma a alcançar e a assegurar o bom estado ecológico e químico de todos os corpos de água Europeus até 2015, através da execução de programas de medida especificados em PGRH ^[27,42,43,45].

A água deve ser restituída à natureza de forma a causar o menor nível de perturbação possível no ecossistema. O estado ecológico é expresso como o desvio obtido em relação às condições de referência naturais, nas quais as comunidades biológicas suportam a menor alteração antropogénica possível, sem efeitos de industrialização, urbanização e intensificação da agricultura. Neste contexto, a monitorização biológica torna-se relevante devido ao biota ser o fator chave na avaliação dos ecossistemas ^[3,42,45].

No Anexo V encontram-se as cinco classificações do estado ecológico da água referente à qualidade estrutural e funcional dos ecossistemas aquáticos: excelente, bom, razoável, medíocre e mau. Esta distribuição, baseia-se em parâmetros de qualidade físico-químicos, biológicos e hidromorfológicos, os quais variam consoante o tipo de água a avaliar ^[6].

O estado químico da água deve-se à presença de substâncias químicas no

ambiente aquático, que podem ser suscetíveis de causar danos significativos na saúde humana, na fauna e na flora, como resultado das características de toxicidade, persistência e bioacumulação. Os elementos físico-químicos e hidromorfológicos são considerados como elementos de suporte, que condicionam e determinam as comunidades biológicas. Desta forma, os elementos biológicos assumem um papel predominante na avaliação do estado ecológico, constituindo a base para a classificação ecológica [10,42].

A DQA requer a avaliação de parâmetros de qualidade biológica, no entanto, antes de esta entrar em vigor, os programas de controlo da qualidade da água da maioria dos Estados-Membros da UE baseavam-se principalmente em análises físico-químicas e microbiológicas [9,42,43,46]. Em Portugal há insuficiência de dados de elementos biológicos normalizados e sistematizados e, apesar de existirem programas de monitorização de elementos químicos desde o início dos anos 80, os dados obtidos revelaram problemas ao nível de consistência e qualidade [27].

A DQA visa assegurar o estabelecimento de um programa de controlo adequado, mencionando os elementos a avaliar, mas sem referir os métodos a utilizar. Nesse sentido, a implementação da DQA nos países menos desenvolvidos representa um enorme desafio, tendo como causa, a ausência de metodologias próprias e a necessidade de adoção de procedimentos aplicados noutros países, devendo o processo de seleção basear-se no conhecimento científico do país e na diversidade dos *habitats* [6,10].

O sucesso da implementação da DQA depende da disponibilidade de ferramentas de baixo custo e de tecnologias capazes de fornecer dados adequados e fidedignos. Além do mais, o facto de enormes bacias hidrográficas englobarem vários países, torna importante assegurar que os dados obtidos por diferentes Estados-Membros da UE sejam de qualidade comparável e apropriada. Por este motivo, torna-se necessário realizar duplicados, ensaios interlaboratoriais, e utilizar métodos analíticos e materiais de referência certificados [44].

Devido a não ser economicamente viável eliminar de uma só vez as substâncias químicas suscetíveis de causar danos significativos no meio aquático, foram estabelecidas estratégias e identificadas as substâncias perigosas que devem ser reduzidas ou eliminadas prioritariamente em descargas e emissões para águas superficiais. No anexo X encontra-se a lista dessas substâncias, tendo os critérios de seleção se baseado na combinação do grau de perigosidade com a exposição ambiental a essas mesmas substâncias [28,39,41].

A DQA especifica três tipos de controlo: operacional, de investigação e de vigilância. O controlo operacional fornece dados essenciais relativamente a águas em

risco ou que não cumpram os objetivos impostos na DQA, enquanto o controlo de investigação permite avaliar as causas. Após alcançar o estado de boa qualidade é necessário implementar um controlo de vigilância, de modo a preservar o estado alcançado e a avaliar as alterações da qualidade da água a longo prazo, fornecendo uma base de referência sobre as bacias hidrográficas [43].

As etapas que envolvem os três tipos de controlo requerem a utilização de um conjunto de ferramentas adequado, que permita obter dados representativos e fiáveis, indicando a extensão e complexidade da informação necessária para alcançar a gestão da água com sucesso. É de mencionar, que embora a maioria das ferramentas possa ser utilizada em todos os tipos de controlo, algumas podem ser mais apropriados para determinados locais ou situações, dependendo a seleção das características da água, dos custos associados, da robustez e sensibilidade dos métodos, do tipo de medida e da informação requerida [43].

2.2. Parâmetros de caracterização da água e sua importância

A avaliação convencional da qualidade da água tem sido geralmente baseada na medida de parâmetros físico-químicos (temperatura, pH, condutividade, oxigénio dissolvido – OD, carência química de oxigénio – CQO, carência bioquímica de oxigénio ao fim de 5 dias – CBO₅, e metais dissolvidos como ferro, manganês, zinco, cobre, crómio, selénio, cádmio, chumbo, mercúrio e arsénio) e microbiológicos (coliformes totais, coliformes fecais e estreptococos fecais) [46].

A DQA descreve os parâmetros que permitem monitorizar a qualidade de água doce, os quais se classificam em físico-químicos, biológicos e hidromorfológicos. De acordo com esta diretiva, a caracterização físico-química envolve a determinação de condições térmicas (temperatura), condições de oxigenação (OD e taxa de saturação de oxigénio), contaminação orgânica (CQO e CBO₅), salinidade (condutividade elétrica), estado de acidificação (pH, alcalinidade e dureza) e condições relativas aos nutrientes (nitratos, nitritos, azoto amoniacal, azoto total, ortofosfatos e fósforo total). A componente biológica refere-se ao fitoplâncton (cianobactérias, algas, macrófitas e fitobentos), invertebrados bentónicos (moluscos, crustáceos, vermes e insetos) e fauna piscícola, enquanto as características hidromorfológicas dizem respeito à vegetação ribeirinha, ao caudal e à profundidade [6,10,28].

Em amostras que correspondem a uma mistura de substâncias de natureza química complexa, as análises físico-químicas apenas permitem identificar e quantificar a concentração das substâncias isoladas que forem selecionadas. Assim, não é analítica

nem economicamente viável detetar, identificar e quantificar todos os componentes presentes, nem é possível distinguir especificamente as substâncias que contribuem para a toxicidade ^[8,47].

Os contaminantes perigosos, mesmo sendo tóxicos a partir de concentrações muito baixas, se estiverem disponíveis em concentração inferior ao limite de deteção não são detetados, podendo a exposição prolongada dos organismos aquáticos levar a efeitos crónicos de toxicidade. Além disso, o tratamento convencional de efluentes geralmente não leva à eliminação total dos compostos tóxicos, podendo a degradação parcial dar origem a subprodutos que não são medidos, e que podem ser ainda mais tóxicos do que os compostos iniciais ^[8,47].

A toxicidade de misturas complexas é muito difícil de prever, pois podem ocorrer efeitos de interação entre as diversas substâncias de modo aditivo, sinérgico ou antagónico. Nesta conformidade, a descarga contínua de efluentes, mesmo com concentrações de produtos químicos dentro dos limites estabelecidos nos critérios de qualidade da água, pode causar efeitos adversos nos ecossistemas como consequência das interações entre as diversas substâncias resultarem numa toxicidade significativa para os organismos aquáticos ^[47-51].

Quando a descarga de contaminantes perigosos é intermitente, esta pode não ser perceptível em análises pontuais no tempo. Por sua vez, se os poluentes forem biodegradáveis, será mantido o equilíbrio a uma certa distância do ponto de lançamento, tendo os organismos da área circundante dificuldade em sobreviver, alterando consequentemente a estrutura e o funcionamento do ecossistema aquático. Além disso, os organismos podem reter os contaminantes do ambiente armazenando-os em si, dando origem à bioacumulação ^[47-51].

A sobrevivência de todas as espécies de organismos aquáticos só é alcançada protegendo a biodiversidade do ecossistema, e garantindo a qualidade no que diz respeito às características ecotoxicológicas. Desta forma, embora a avaliação físico-química e microbiológica seja muito importante para o controlo da qualidade da água, tem-se verificado cada vez mais ser por si só insuficiente, devido a não avaliar o impacto dos poluentes no ecossistema ^[9,11,52-54].

Os métodos biológicos, surgem deste modo, como uma ferramenta complementar de interpretação de dados, que permitem avaliar a contaminação aquática tendo em conta o transporte, a distribuição, a transformação e o destino final dos contaminantes tóxicos. Neste contexto, a combinação de parâmetros físico-químicos, microbiológicos e ecotoxicológicos constitui uma mais-valia para um eficiente controlo da qualidade da água, permitindo avaliar o nível de toxicidade dos contaminantes, de forma a identificar e prevenir a contaminação do ecossistema aquático ^[9,11,47,49,53,54].

A avaliação da toxicidade deve incluir também a matéria sedimentada, uma vez que, os poluentes podem estabelecer ligações com a matéria orgânica presente nos sedimentos dando origem a quelatos. Estes sedimentos, podem por outro lado, adsorver substâncias tóxicas, que em determinadas condições ambientais poderão ser desorvidas e libertadas para a água [11,51].

3. Ecotoxicidade

O ecossistema aquático é composto pelos organismos vivos e pela água envolvente. Assim, a água é simultaneamente o *habitat* dos organismos e o meio de transporte e depósito final dos contaminantes. Embora o sistema aquático possua inúmeros mecanismos físicos, químicos e biológicos que permitem assimilar elevados níveis de contaminantes, modificando a natureza e a concentração dos poluentes, estes podem produzir uma resposta adversa no sistema biológico colocando a vida aquática em perigo [7,55].

A ecotoxicidade é uma medida que reflete o potencial tóxico integrado dos poluentes sobre a fauna e a flora, e permite prever o impacto de reduzidas concentrações tóxicas durante longos períodos de tempo, estimando a concentração segura ou sem efeito nas espécies aquáticas em contacto com a água recetora [55-57].

A toxicidade da água, sedimentos ou lamas pode ser avaliada em laboratório ou localmente, através de ensaios com organismos de água doce ou marinhos, que funcionam como biossensores. Os bioensaios consistem na exposição de organismos-teste a diferentes concentrações de substâncias tóxicas, sendo após determinado período de tempo avaliados os efeitos tóxicos que se podem manifestar de forma letal ou sub-letal (por exemplo: alterações na reprodução, no crescimento, na atividade locomotora, na taxa de ventilação branquial, na frequência cardíaca, na função olfativa ou na atividade enzimática). A resposta é comparada com a obtida nas condições de controlo isentas de agentes tóxicos, e as séries de medidas concentração-resposta são quantificadas através de técnicas estatísticas [43,48,57-59].

O controlo da ecotoxicidade representa assim uma abordagem eficaz do ponto de vista de proteção do meio aquático, permitindo determinar a qualidade da água, prever o impacto ambiental de águas residuais contaminadas, estabelecer os níveis de toxicidade permitidos em descargas ambientais, e avaliar a eficiência das técnicas de tratamento de águas residuais. Permite ainda, comparar a sensibilidade específica dos vários organismos-teste e avaliar os efeitos estimulantes ou inibidores, a bioacumulação, a biodegradação e o transporte dos poluentes. Porém, é de referir, que devido à dificuldade em extrapolar os resultados de toxicidade para os seres humanos, os testes de toxicidade não permitem obter uma resposta absoluta sobre o risco que uma determinada amostra apresenta para a população humana [8,9,48,52,60].

3.1. Fatores que influenciam a toxicidade

O estudo do efeito dos poluentes no ecossistema como um todo é extremamente complexo. A toxicidade de um composto químico no meio aquático depende do contacto entre o organismo e o composto tóxico, e da respetiva reação, os quais podem ser influenciados por diversos fatores, nomeadamente a simulação laboratorial de cenários realistas, o tipo de organismo exposto e a sua sensibilidade, as características e a concentração de agente tóxico, as características físico-químicas da água que rodeia o organismo, e a duração e a frequência da exposição [7,43,48,57,61].

A simulação laboratorial de cenários realistas podem influenciar a toxicidade, pois apesar de o controlo dos parâmetros ambientais, tais como luz artificial, temperatura e fotoperíodo ser fundamental para eliminar possíveis interações significativas, estes podem alterar a toxicidade devido a alguns compostos serem fotodegradáveis ou hidrolisáveis, podendo alguns pesticidas ser mais tóxicos a temperaturas baixas, enquanto alguns metais, como o cádmio, apresentar maior toxicidade a temperaturas elevadas [8,11,61].

A sensibilidade dos organismos aos compostos químicos varia de acordo com a idade, a fase de desenvolvimento, o tamanho, o estado nutricional e as características genéticas. Os indivíduos jovens ou imaturos apresentam normalmente maior sensibilidade aos agentes químicos do que os indivíduos adultos. Deste modo, são normalmente utilizados nos testes organismos com curto período de vida, os quais funcionam como primeiros indicadores de alarme, sendo os organismos de vida mais longa adequados para químicos bioacumuláveis. O facto de os organismos estarem na presença de vários compostos simultaneamente pode aumentar a sensibilidade [11,48,49,57,61].

As características mais relevantes dos compostos químicos são geralmente a solubilidade, a pressão de vapor, o comprimento da cadeia alquílica, o conteúdo iónico e a perda durante o período do teste por evaporação, degradação ou adsorção. Para além disso, a composição e o grau de pureza podem também influenciar a toxicidade, pois algumas impurezas ou contaminantes podem ser consideravelmente mais tóxicos do que o agente propriamente dito. O modo de ação pode afetar também a toxicidade, pois existem compostos químicos cuja ação não é seletiva e provocam efeitos indesejáveis em numerosas células e tecidos dos organismos aquáticos, existindo outros compostos cujo modo de ação seletivo afeta adversamente apenas um tipo de célula ou tecido, sendo inofensivo para os restantes [61-63].

Os compostos lipofílicos ligam-se fortemente e são facilmente adsorvidos por partículas em suspensão, matéria orgânica ou sistemas biológicos, enquanto os

compostos hidrossolúveis estão mais prontamente disponíveis para os organismos. Então, enquanto os agentes químicos hidrossolúveis penetram nos organismos através de toda a superfície do corpo, guelras e boca, os agentes lipofílicos são ingeridos e adsorvidos apenas através do trato intestinal [61].

As características físicas e químicas da água que rodeia o organismo mais relevantes são o conteúdo de matéria orgânica e de material particulado em suspensão, a temperatura, a luminosidade, o pH, a salinidade, a dureza, a CQO, a CBO₅, o OD, e a velocidade de escoamento da água [7,10,28,63].

A duração da exposição dos organismos ao agente químico pode variar entre horas e anos, podendo não ser representativa devido à possibilidade de não abranger momentos de descargas pontuais como fluxos de água provenientes de campos agrícolas após chuvas, e lançamentos de efluentes industriais durante determinados períodos de tempo. Por outro lado, determinadas substâncias movem-se lentamente nos tecidos, podendo apresentar toxicidade inferior à de substâncias que se movem mais rapidamente [7,61].

A frequência da exposição influencia também a toxicidade dos compostos químicos, na medida em que uma exposição pode ter como consequência um efeito adverso imediato num organismo, podendo por outro lado, duas exposições sucessivas iguais à exposição única ter um efeito nulo ou reduzido devido à adaptação do organismo ao composto [7,61].

As referidas características, para além de influenciarem a toxicidade podem também alterar a biodisponibilidade, a persistência, a transformação e o destino do agente químico no ambiente [7,61].

3.2. Parâmetros de avaliação da toxicidade

A ecotoxicidade pode ser avaliada qualitativamente ou quantitativamente, através de parâmetros letais ou sub-letais. Logo, a avaliação nos testes de toxicidade pode incluir a morte, a imobilização, ou alterações na reprodução, no crescimento, na atividade locomotora, na taxa de ventilação branquial, na frequência cardíaca, na função olfativa ou na atividade enzimática. Uma vez que não é viável medir todos estes parâmetros, a avaliação é normalmente limitada à mortalidade, ao crescimento e à reprodução [8,11,57,64].

Os resultados dos testes de ecotoxicidade podem ser expressos pela concentração letal (CL) ou pela concentração efetiva (CE), sendo normalmente estes parâmetros estudados para a percentagem de 50% dos organismos, devido a se obter maior reprodutibilidade nas respostas, o que permitir avaliar a toxicidade com maior rigor.

Assim, a CL_{50} consiste na concentração de substância tóxica que provoca mortalidade a 50% da população dos organismos, enquanto a CE_{50} diz respeito à concentração que causa um parâmetro sub-letal, como por exemplo a imobilidade, a 50% dos organismos [8,11,57,64].

Outra forma de exprimir os resultados é através da concentração de efeito não observado (CENO) e da concentração de efeito observado (CEO). A CENO refere-se à maior concentração de substância tóxica que não dá origem a efeitos adversos, ao passo que a CEO corresponde à menor concentração de agente tóxico capaz de provocar efeitos adversos. Desta forma, a CENO representa a concentração de agente tóxico considerada como segura para o ecossistema, sendo por isso a concentração imediatamente abaixo da CEO. Não obstante, se o efeito não for validado estatisticamente, o valor não poderá ser considerado seguro [8,11,57,64].

Os parâmetros CL_{50} , CE_{50} , CENO e CEO são normalizados em função do ambiente a que os organismos são expostos, sendo geralmente expressos em miligramas de substância por litro de solução preparada com água de diluição. Contudo, é de referir que a concentração molar proporcionaria uma avaliação mais precisa, devido à toxicidade se relacionar com o número de moléculas de substância que interagem com o sítio alvo. Estes parâmetros exprimem uma relação inversa à toxicidade da amostra testada, pois quanto menor forem estes valores, maior será a toxicidade. De forma a facilitar a comparação, estes resultados podem ser transformados em unidades tóxicas agudas (UT_a) através de $100/(CE_{50}$ ou $CL_{50})$, ou unidades tóxicas crónicas (UT_c) por meio de $100/(CENO$ ou $CEO)$. Estes parâmetros permitem obter uma relação direta, sendo a toxicidade tanto maior quanto mais elevado for o valor numérico destes [8].

A avaliação de diferentes concentrações permite obter diferentes níveis de toxicidade, sendo necessário recorrer a métodos estatísticos para interpretar os resultados obtidos nos testes, e determinar o valor representativo do conjunto. A relação dose-resposta representa a relação entre a concentração de agente tóxico e a resposta da população, permitindo a análise desta relação estimar a percentagem de organismos que manifesta efeito para determinada concentração [8].

A Figura 3.1 representa a relação dose-resposta tipicamente obtida em testes de ecotoxicidade.

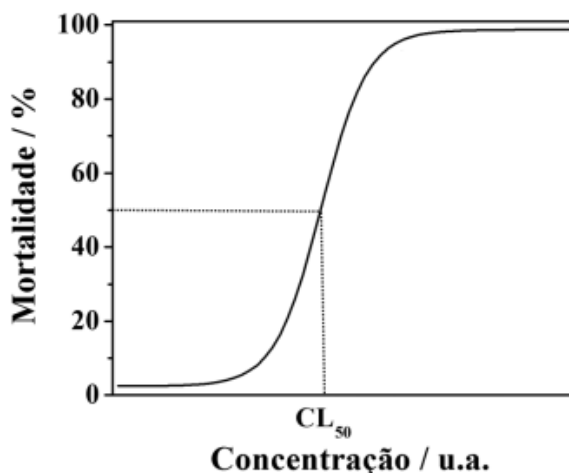


Figura 3.1 – Representação da relação dose-resposta tipicamente obtida em testes de ecotoxicidade [8].

A sensibilidade dos organismos às substâncias tóxicas determina o coeficiente angular e a forma da curva. Geralmente a curva obtida é do tipo sigmoide, apresentando uma região inicial em que não se verifica o efeito tóxico, uma região intermédia em que a toxicidade cresce rapidamente, e uma região final em que a resposta não aumenta significativamente. Nesta dialética, é possível concluir que existe uma dose baixa para a qual nenhum organismo responde e uma dose alta para a qual todos os organismos respondem [8,11,57].

3.3. Efeito de interação

A avaliação da forma como os diferentes constituintes presentes numa mistura interagem é fundamental, pois pode afetar adversamente as funções fisiológica e biológica dos organismos-teste, e conseqüentemente condicionar a estratégia de avaliação da ecotoxicidade a adotar [50,52].

O efeito de interação que ocorre entre os diferentes constituintes é considerado na maioria das vezes como aditivo, em que as substâncias químicas presentes têm o mesmo modo de ação tóxica, e portanto, a toxicidade global representa a soma da toxicidade dos componentes individuais. Todavia, a interação pode também ocorrer de forma sinérgica ou antagônica. O efeito sinérgico ocorre quando a toxicidade da mistura é superior à adição da toxicidade dos seus constituintes, enquanto o efeito antagônico sucede quando a toxicidade de uma mistura é inferior à soma da toxicidade dos componentes isolados [8,50,52,65].

3.4. Classificação dos testes de toxicidade

A seleção do tipo de teste a utilizar é efetuada de acordo com os objetivos, os recursos disponíveis, os requisitos dos organismos-teste, as características do efluente e a flutuação da toxicidade. Os ensaios podem ser classificados de acordo com o período de exposição dos organismos-teste relativamente ao seu ciclo de vida, e mediante a renovação das soluções-teste ^[57].

3.4.1. Classificação dos testes de toxicidade de acordo com a exposição dos organismos-teste

Os ensaios de ecotoxicidade podem ser classificados em agudos ou crónicos, de acordo com a duração do teste relativamente ao ciclo de vida do organismo, e a resposta final destes.

3.4.1.1. Testes de toxicidade aguda

A toxicidade aguda resulta geralmente de derrames acidentais e do lançamento no ecossistema de pesticidas e de efluentes domésticos e industriais não tratados. Os ensaios de toxicidade aguda consistem em expor os bioindicadores a uma elevada concentração de substâncias tóxicas, durante um curto período de tempo em relação ao ciclo biológico do organismo-teste. A duração deste tipo de teste varia geralmente entre 24 e 96 horas, caracterizando-se por uma resposta severa e rápida dos organismos aquáticos, devido a estes absorverem rapidamente as substâncias tóxicas, podendo também ocorrer efeitos retardados ^[8,57,61].

Durante a realização deste tipo de ensaio, os organismos não são geralmente alimentados, sendo a toxicidade aguda avaliada pela concentração de agente tóxico que causa morte ou imobilização, e expressa respetivamente através dos parâmetros CL_{50} e CE_{50} ^[8,11].

A facilidade em observar os parâmetros referidos, juntamente com o facto de os testes serem rápidos, torna este tipo de teste numa valiosíssima ferramenta de avaliação da ecotoxicidade, tendo sido por estes motivos largamente utilizado nas primeiras avaliações realizadas com compostos tóxicos puros e efluentes complexos. No entanto, este tipo de teste nem sempre reflete o efeito tóxico das substâncias, principalmente quando se encontram em baixa concentração, sendo por isso considerado um método de

diagnóstico que fornece informação base para estudos mais criteriosos. Assim, quando os ensaios agudos não são suficientes para caracterizar o efeito tóxico torna-se imprescindível complementar a avaliação da toxicidade com testes crônicos [8,11,48,57,60].

3.4.1.2. Testes de toxicidade crónica

A toxicidade crónica ocorre frequentemente com o lançamento contínuo de efluentes tratados, que mesmo tendo baixa concentração de compostos tóxicos, esta aumentará progressivamente com o tempo [8,11].

Os testes de toxicidade crónica consistem na exposição dos organismos-teste a baixas concentrações de substâncias tóxicas, durante um longo período de tempo quando comparado com o seu ciclo de vida, sendo em muitos testes utilizados 7 dias [8]. Os efeitos induzidos pela exposição crónica normalmente desenvolvem-se lentamente, podendo também ser rápidos e imediatos. A extensão do período de exposição, incluindo um ou mais ciclos de vida, pode provocar efeitos sub-letais e permitir obter uma concentração limite tóxica mais rigorosa, sendo expressa pelos parâmetros CE_{50} , CENO ou CEO [8,11,57,61].

3.4.2. Classificação dos testes de toxicidade de acordo com a renovação das soluções-teste

De forma a garantir um meio com concentração constante ao longo dos ensaios de ecotoxicidade, especialmente nos de longa duração, é necessário ter algumas precauções, tais como o período de renovação das soluções-teste. Nesse sentido, os ensaios de ecotoxicidade podem ser classificados em estáticos, semi-estáticos e dinâmicos, de acordo com o método de adição das soluções que contêm o agente tóxico [8].

3.4.2.1. Testes estáticos

Nos testes de ecotoxicidade estáticos a solução-teste não é renovada, sendo por isso os organismos expostos à mesma solução durante todo o ensaio. Este tipo de teste é adequado para amostras que não sejam voláteis e que sejam estáveis em meio aquoso, permitindo manter ao longo do ensaio concentrações de exposição acima de

80% do valor inicial [8,57,66].

Relativamente às vantagens que este tipo de teste apresenta, é possível realçar a simplicidade, o baixo custo, a reduzida necessidade de recursos (espaço, mão-de-obra e equipamento), a possibilidade de realizar um elevado número de testes no mesmo período de tempo, e a necessidade de uma quantidade de soluções-teste inferior à necessária para os regimes semi-estático e dinâmico. Porém, este tipo de teste apresenta também algumas desvantagens, destacando-se a diminuição do OD que pode dar origem à formação de produtos metabólicos, e a perda de tóxicos por volatilização e/ou adsorção pelos recipientes de ensaio reduzindo a toxicidade aparente. Estes motivos podem levar a que a sensibilidade destes testes seja geralmente inferior à dos testes semi-estáticos [57].

3.4.2.2. Testes semi-estáticos

Nos testes semi-estáticos, ou estáticos com renovação, a solução-teste é renovada periodicamente, sendo os organismos transferidos para outra câmara de ensaio e adicionada uma solução fresca com a mesma concentração, ou substituindo apenas uma parte da solução na câmara de teste. O período de renovação das soluções-teste depende dos organismos utilizados, sendo geralmente de 24 ou 48 horas [8,48,57].

Este tipo de ensaio é recomendado para amostras que apresentem substâncias tóxicas instáveis ou voláteis, com elevado valor de CQO e/ou de CBO₅, que contenham população bacteriana na sua composição, e para situações em que é esperado que ao longo do ensaio as concentrações de exposição alcancem valores abaixo de 80% do valor inicial. Desta forma, é possível manter a concentração constante ao longo do teste, sendo a modificação do procedimento de teste relativamente simples, na qual são requeridos alguns cuidados com a manipulação para não provocar *stress* nos organismos-teste [8,57,66].

As vantagens deste tipo de ensaio prendem-se com as reduzidas possibilidades de perda de tóxicos por volatilização e/ou adsorção pelos recipientes de ensaio e de o OD diminuir devido à elevada CQO, CBO₅ ou efeitos nocivos de resíduos metabólicos de organismos nas soluções-teste. Para além disso, os organismos-teste esgotam rapidamente as reservas energéticas sendo novamente alimentados aquando da renovação da solução-teste. Como desvantagem é possível referir a necessidade de maior volume de solução-teste relativamente ao regime estático [57].

3.4.2.3. Testes dinâmicos

Nos testes dinâmicos as soluções-teste são continuamente renovadas. Este tipo de teste é recomendado para ensaios de toxicidade crónica e nos casos em que o regime estático com período de renovação de 24 horas não permite manter constante a concentração de exposição ^[8,66].

Este tipo de teste apresenta a vantagem de permitir manter constante a concentração de agente tóxico ao longo do ensaio, apresentando no entanto como desvantagens o facto de a mão-de-obra e os custos serem mais elevados relativamente aos testes estáticos e semi-estáticos.

3.5. Organismos-teste

A toxicidade do meio aquático pode condicionar o desenvolvimento dos organismos pertencentes aos diferentes níveis tróficos, pelo que estes podem refletir a qualidade da água e funcionar como indicadores biológicos nos ensaios de ecotoxicidade ^[7,43,52,67].

Os organismos que permitem avaliar a ecotoxicidade devem completar todo ou praticamente todo o ciclo de vida na água, podendo ser marinhos ou de água doce, e ser cultivados em laboratório ou recolhidos em locais de referência. Para além do mais, devem ser representativos dos distintos níveis do ecossistema e apresentar como características elevada sensibilidade às substâncias tóxicas, seletividade constante e elevada aos contaminantes, elevada abundância, ampla distribuição geográfica, importância comercial e ecológica, de fácil cultivo, e facilmente adaptáveis às condições laboratoriais. De forma a facilitar a interpretação dos resultados obtidos, deve ainda ser bem conhecido o comportamento das espécies utilizadas, assim como a fisiologia e a genética. Tal como já foi referido, os organismos com curto período de vida funcionam como primeiros indicadores de alarme, e os organismos de vida mais longa são adequados para testes com produtos químicos bioacumuláveis ^[8,11,48,55,57,60].

Na Tabela 3.1 encontram-se os níveis tróficos da pirâmide ecológica, os organismos representativos e as espécies mais utilizadas nos testes de ecotoxicidade.

Tabela 3.1 – Níveis tróficos da pirâmide ecológica, organismos representativos e espécies mais utilizadas nos testes de ecotoxicidade ^[adaptado de 68].

Nível trófico	Organismo representativo	Espécie-teste mais utilizada
Decompositor	Bactéria	<i>Vibrio fischeri</i>
Produtor primário	Alga	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> <i>Scenedesmus subspicatus</i>
	Planta aquática	<i>Lemna minor</i>
Consumidor primário	Crustáceo	<i>Daphnia magna</i> (de água doce) <i>Artemia salina</i> (de água salgada)
Consumidor secundário	Peixe	<i>Danio rerio</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i>

Embora não seja verdadeiro para todos os tipos de substâncias, a avaliação da toxicidade com espécies marinhas ou de água doce é considerada equivalente. As espécies utilizadas a nível mundial apresentam várias vantagens, contudo, a utilização de espécies nativas permite obter maior segurança nas análises de campo realizadas localmente ^[12,69,70].

A definição de um modelo biológico apropriado é um dos passos mais importantes no desenvolvimento dos testes de ecotoxicidade. Têm sido realizados esforços no sentido de encontrar uma espécie de organismo padrão, que seja sensível à maioria dos compostos químicos. Não obstante, os diferentes metabolismos e *habitats* conduzem a diferentes características, e à manifestação de diferente sensibilidade à toxicidade. Assim, não é possível extrapolar o efeito tóxico desenvolvido numa espécie de organismos para outras espécies ^[8,9,48,52,57,70].

A sensibilidade dos organismos é o fator limitante, sendo as diversas espécies utilizadas de acordo com os objetivos do estudo. A realização de testes com vários tipos de organismos permite comparar a sensibilidade destes à mesma substância, permitindo o organismo mais sensível estimar a toxicidade com maior rigor. Além disso, permite aumentar a probabilidade de detetar um efeito tóxico e prever com maior segurança o impacto dos agentes tóxicos no corpo recetor ^[8,49,57,71]. Nesta dialética, as baterias de bioensaios com organismos pertencentes aos diferentes níveis tróficos representam valiosas ferramentas na avaliação da ecotoxicidade. Apesar de ter sido já verificado em diversos trabalhos que os diferentes organismos se comportam de forma distinta na presença de compostos tóxicos, a maior parte dos estudos publicados incluem apenas um indicador, pois a utilização de todos os níveis tróficos tornaria o teste muito mais dispendioso e moroso.

3.5.1. Bactérias

As bactérias são organismos decompositores que podem estar presentes em qualquer meio aquático. Este tipo de bioindicador apresenta como vantagens o facto de ser económico, de poder ser fornecido pelos fabricantes na forma liofilizada podendo ser armazenado em laboratório durante vários meses, e de fornecer uma rápida resposta, tornando-se por isso ideal para uma primeira abordagem relativamente à ecotoxicidade. Apesar de a maioria dos testes de ecotoxicidade serem realizados com algas, crustáceos e peixes, as experiências com bactérias são extremamente úteis devido a adaptarem-se facilmente a ensaios de campo e a requererem volumes de amostra e tempos de exposição muito inferiores aos necessários para os restantes organismos-teste [7,8,48,59,60].

Os efeitos tóxicos podem-se manifestar de diferente forma, permitindo a enzima Adenosina Trifosfatase (ATPase) avaliar a atividade enzimática, podendo as bactérias *Spirillum volutans* inferir relativamente à alteração da mobilidade, *Vibrio fischeri* (anteriormente designada por *Photobacterium phosphoreum*) estimar a inibição da emissão de luz, e *Pseudomonas putida* calcular a viabilidade celular. A simplicidade, rapidez e baixo custo dos testes com fungos e leveduras torna viável a utilização destes na avaliação do potencial tóxico de efluentes e da biodegradabilidade de novos compostos [10,48].

A bactéria marinha luminescente *Vibrio fischeri* (Figura 3.2) é a mais utilizada. Esta bactéria é de gram negativo e possui um ciclo de vida relativamente pequeno. Em condições favoráveis e com concentrações de oxigénio acima de 0,5 mg/L emite luz proporcionalmente à atividade metabólica da população bacteriana [7,8,55,60,68,72].

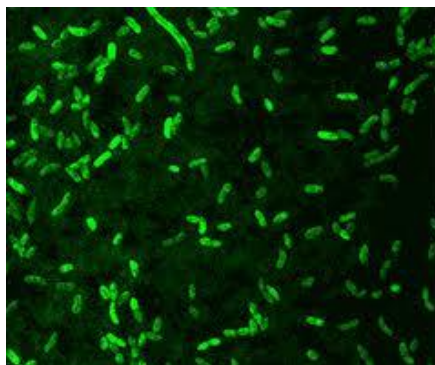


Figura 3.2 – Bactéria marinha luminescente *Vibrio fischeri* [73].

O mecanismo de emissão de luminescência consiste na reação de oxidação do estado reduzido do mononucleótido flavina (FMNH₂) catalisada pela luciferase, que dá origem ao estado oxidado (FMN), sendo acompanhada pela libertação de luz. Este mecanismo relaciona-se estritamente com o metabolismo bacteriano, pois os fatores que o afetam têm efeito na emissão de luminescência. Desta forma, quando uma bactéria luminescente é exposta a substâncias tóxicas e a quantidade de químicos xenobióticos acumulados na membrana plasmática excede o limite tolerável, ocorre inibição da atividade enzimática, que conduz a uma diminuição da intensidade luminescente [7,55,68,74].

3.5.2. Algas e plantas aquáticas

As algas são produtores primários, e por isso, uma perturbação neste nível irá afetar o funcionamento de níveis superiores. Neste contexto, o referido nível trófico desempenha um papel crucial no ecossistema aquático, reforçando a sua inclusão nos parâmetros de qualidade biológica de avaliação da qualidade da água impostos pela DQA [3].

Este tipo de organismo é muito frequentemente utilizado em estudos de ecotoxicidade devido a apresentar uma ampla distribuição geográfica, elevada sensibilidade a alterações de pequena escala nas condições ambientais em que estão inseridos, baixa variabilidade genética e fenotípica, bom conhecimento dos nutrientes necessários e ciclo de vida relativamente curto permitindo um rápido crescimento e a avaliação de várias gerações. Para além do mais, as algas obtêm os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento diretamente da água, são facilmente mantidas em culturas laboratoriais e têm capacidade de crescer em meios sintéticos bem definidos. No entanto, este nível trófico apresenta a desvantagem de por vezes não apresentar reprodutibilidade [8,26,52,60,67].

A utilização de algas unicelulares permite obter resultados com maior reprodutibilidade, credibilidade e robustez, comparativamente aos organismos multicelulares. Por este motivo, estas são as espécies de algas mais frequentemente utilizadas nos testes de ecotoxicidade, devendo ser verdes e de água doce. A seleção da espécie a utilizar deverá ter em conta a abundância e a importância ecológica. Algumas das algas utilizadas em ensaios de ecotoxicidade têm a seguinte designação: *Pseudokirchneriella subcapitata* (anteriormente conhecida por *Selenastrum capricornutum*) (Figura 3.3-A), *Scenedesmus subspicatus* (igualmente designada por *Desmodesmus subspicatus*) (Figura 3.3-B), *Chlorella vulgaris*, *Thalassiosira weissfloggi* e *Ulva pertusa* [8,52,67,68].

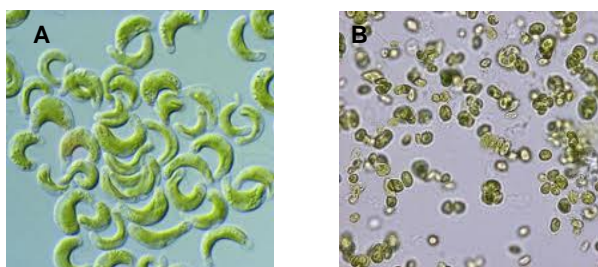


Figura 3.3 – Algas: A) *Pseudokirchneriella subcapitata*; B) *Scenedesmus subspicatus* [75,76].

A alga *Pseudokirchneriella subcapitata* é das espécies mais utilizadas nos testes de ecotoxicidade, a qual não possui flagelos e é facilmente reconhecida pela sua forma de crescimento helicoidal. A reprodução ocorre de forma assexuada (partenogénese) através de auto-esporos, produzindo pequenas réplicas da célula mãe que se dividem uniformemente sem aderir às superfícies. A referida alga, apesar de se encontrar normalmente em água doce tem a capacidade de tolerar condições de salinidade [49,77].

A alga *Chlorella vulgaris* é económica, fácil de preparar em laboratório e apresenta elevada sensibilidade a substâncias tóxicas. A alga *Ulva pertusa* é um bioindicador promissor que apresenta elevada sensibilidade a vários metais tóxicos e compostos orgânicos [49,52].

As plantas aquáticas são também representativas dos produtores primários, e têm sido frequentemente utilizadas na avaliação da ecotoxicidade devido a apresentarem pequenas dimensões, estrutura simples, reprodução assexuada e elevada taxa de crescimento. Contudo, é de referir que algumas plantas vasculares podem acumular substâncias tóxicas, e por isso apresentar menor sensibilidade aos efeitos tóxicos relativamente às algas [48,68].

Os bioensaios baseados em plantas aquáticas caracterizam-se pelo baixo custo de manutenção e pela utilização de diferentes parâmetros de avaliação, tais como taxa de germinação, peso da biomassa e atividade enzimática. Este tipo de testes apresenta como desvantagem o facto de necessitar de tempos longos para permitir medir a alteração do comprimento da raiz, sendo geralmente considerados 4 a 6 dias [60].

O género de planta mais utilizado é de água doce e designa-se por *Lemna spp*, sendo as espécies *Lemna minor* (Figura 3.4), *Lemna gibba* e *Lemna perpusilla* as mais encontradas na literatura. Podem também ser utilizadas sementes de plantas, tal como a alface *Lactuca sativa*, que permitem realizar testes com amostras líquidas e sólidas, como por exemplo solos [57,68].



Figura 3.4 – Planta *Lemna minor* [78].

3.5.3. Crustáceos

Os crustáceos são consumidores primários que se alimentam de produtores primários por filtração, sendo também fonte de alimento para consumidores secundários. Ora, representam um importante elo entre os níveis tróficos inferior e superior da pirâmide ecológica, apresentando por isso importância relevante no controlo da qualidade da água. Não obstante, a elevada sensibilidade de alguns crustáceos a matrizes aquosas altamente poluídas, como águas residuais industriais, faz com que este tipo de indicador nem sempre seja o mais indicado para caracterizar a toxicidade [10,60].

Os crustáceos de água doce mais utilizados pertencem à ordem Cladocera e são do género *Daphnia*. As dáfrias são comumente denominadas por pulgas d'água devido à sua forma de nadar se assemelhar a pequenos saltos e de se encontrarem em praticamente todos os cursos de água (rios, lagos, represas e planícies inundadas). Relativamente à estrutura, possuem um grande olho composto e dois pares de antenas altamente ramificadas, as quais são utilizadas para a locomoção. O tórax e o abdómen estão protegidos por uma concha transparente, que deixa visíveis vários pares de pernas com pêlos. O movimento dos pés gera uma corrente de água, direcionando para a sua boca protozoários, algas, bactérias e detritos orgânicos, dos quais se alimenta [8,9,79].

Este tipo de indicador tem sido largamente utilizado na avaliação da toxicidade devido às diversas vantagens que apresenta, destacando-se a elevada sensibilidade a substâncias químicas incluindo metais, a ampla distribuição em água doce, o ciclo de vida relativamente curto e realizado na água, a facilidade na cultura e na manipulação laboratorial, a grande diversidade de regimes alimentares, os pequenos movimentos de dispersão comparativamente por exemplo aos peixes, a importante posição na cadeia alimentar aquática, o reduzido tamanho e a necessidade de pequenos volumes de amostra-teste [7,8,12,60].

No que diz respeito à reprodução, as dáfias são altamente férteis, pois reproduzem-se tanto de forma sexuada como assexuada. As alterações no ciclo reprodutivo refletem as condições ambientais nos diversos locais, não tendo por isso um padrão rígido de comportamento anual. Geralmente a reprodução ocorre por partenogénese, que se inicia em condições ambientais favoráveis, dando origem a crias de fêmeas geneticamente idênticas e com sensibilidade constante, o que permite minimizar os erros analíticos associados à variação genética dos organismos-teste. Devido ao regime de reprodução partenogénico proporcionar uma rápida expansão da população dafnídia, em condições favoráveis as dáfias são maioritariamente fêmeas. Quando ocorrem alterações ambientais, como a diminuição da quantidade de nutrientes disponíveis, elevada densidade populacional ou fotoperíodo curto, as dáfias respondem alterando a forma de reprodução para sexuada. Após serem produzidos machos, pode ocorrer reprodução sexuada, sendo produzidos ovos resistentes a condições ambientais severas, os quais se designam por efípios [7,8,12,56,60,79].

Existem diversas espécies de dáfias, destacando-se a *Daphnia magna* (Figura 3.5), a *Daphnia carinata* e a *Daphnia pulex*.



Figura 3.5 – Crustáceo de água doce *Daphnia magna* [80].

A *Daphnia magna* tem sido largamente utilizada nos testes de ecotoxicidade devido a ser recomendada como organismo padrão por várias organizações internacionais, podendo-se referir a *International Standard Organization* (ISO) e a *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD). Além disso, possui maior quantidade de informação disponível relativamente às técnicas de cultura, à resposta manifestada à toxicidade, bem como das condições de temperatura e luz necessárias. Todavia, a distribuição geográfica de *Daphnia magna* é limitada, principalmente em áreas de média e baixa latitude, levando a que esta espécie não seja ecologicamente relevante em ambientes aquáticos tropicais e subtropicais, apresentando

a *Daphnia caritana* vantagens relativamente a outras espécies de cladóceros neste tipo de ambientes [7-9,12,60,79].

O crustáceo marinho *Artemia salina* (Figura 3.6), pertencente à classe Branchiopoda, é também muito utilizado nos testes de ecotoxicidade.



Figura 3.6 – Crustáceo marinho *Artemia salina* [81].

Este tipo de crustáceo caracteriza-se pela enorme quantidade de pares de apêndices achatados na região torácica, os quais permitem formar correntes de água para capturar alimentos, aumentando assim a superfície de contacto. Este bioindicador apresenta diversas vantagens, destacando-se o elevado potencial reprodutivo, a alta disponibilidade comercial, a possibilidade de avaliar a toxicidade de amostras com elevada salinidade, e pelo facto de não ser necessário manter culturas contínuas devido a poderem ser mantidos laboratorialmente na forma de ovos, os quais podem ser armazenados durante longos períodos de tempo em ambiente seco ou sob condições anaeróbias [8,60,68].

A Harpacticoida é uma ordem de crustáceos, pertencente à subclasse copépoda, sendo a espécie *Tisbe biminiensis* a mais utilizada nos testes de ecotoxicidade. Este organismo-teste apresenta algumas vantagens, nomeadamente ampla distribuição geográfica, importância na cadeia alimentar marinha, pequeno tamanho e curto ciclo de vida. Para além disso, podem ser produzidos em condições laboratoriais a baixo custo, permitindo obter um armazenamento contínuo de organismos em diferentes estágios do ciclo de vida [70].

3.5.4. Peixes

Os peixes são os principais representantes dos consumidores secundários, constituindo o nível superior da cadeia alimentar do ecossistema aquático. Este nível trófico destaca-se como uma componente indispensável de avaliação de riscos ambientais, devido à contaminação aquática se poder evidenciar pela redução da população de animais residentes e de espécies migratórias de peixes, e por apresentar grande interesse económico, bem como a sua ingestão poder representar uma via de contaminação, de por exemplo, metais e fármacos para o homem [8,48].

As principais vantagens que este tipo de elemento biológico apresenta são: elevada sensibilidade, reprodutibilidade e eficiência; baixo custo; ocupam uma grande variedade de níveis tróficos refletindo os efeitos ambientais em todos os níveis da cadeia alimentar; ocorrem em praticamente todos os tipos de ecossistemas aquáticos; e a sua taxonomia, as exigências ecológicas e os ciclos de vida são aspetos geralmente melhor conhecidos relativamente a outros grupos biológicos. No entanto, apresentam como desvantagens o facto de o ciclo de vida ser superior ao dos restantes níveis tróficos, implicando longos períodos de tempo, a necessidade de equipamento especializado e os grandes volumes de amostra necessários para a realização dos ensaios [6,60].

Podem ser utilizadas diversas espécies de peixes como bioindicadores, sendo de referir as seguintes: *Danio rerio* (vulgarmente conhecido por peixe zebra) (Figura 3.7-A), *Lepomis macrochirus*, *Pimephales promelas* (também designado por *Fathead minnow*) e *Oncorhynchus mykiss* (igualmente designado por truta arco-íris e anteriormente referenciado por *Salmo gairdneri*) (Figura 3.7-B) [8,9,60].

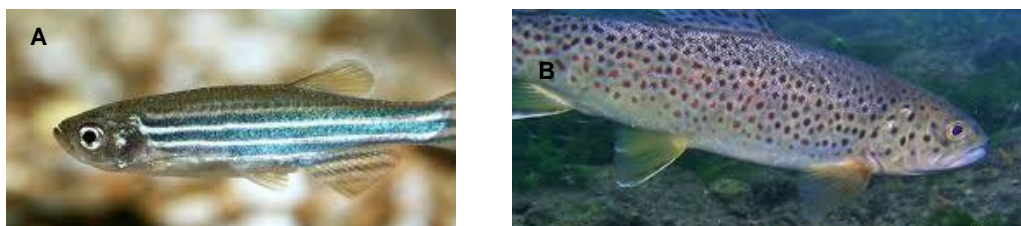


Figura 3.7 – Peixes: A) *Danio rerio*; B) *Oncorhynchus mykiss* [82,83].

O peixe *Danio rerio* é tropical de água doce e é uma das espécies mais utilizadas, devido a possuir elevada capacidade de adaptação a diversas condições ambientais, e por apresentar facilidade na manutenção e na reprodução em laboratório [9,68].

A espécie *Oncorhynchus mykiss* é muito sensível e possui necessidades muito específicas, designadamente água pura e bem oxigenada, enquanto a espécie *Lepomis*

macrochirus diz respeito a um peixe americano de grande porte, presente em lagos e rios lânticos. Os bioindicadores *Oncorhynchus mykiss* e *Lepomis macrochirus* apresentam elevada sensibilidade, e possuem uma larga base de dados que caracteriza a resposta aos contaminantes ambientais [48,60].

3.6. Avaliação e identificação da toxicidade

Os testes de ecotoxicidade permitem ir mais além do que prever o impacto das substâncias tóxicas no ecossistema. Uma vez que nem todas as substâncias contribuem para a toxicidade, é fundamental separar e identificar as substâncias tóxicas, sobretudo em amostras complexas, para compreender a causa da toxicidade observada, bem como para remover ou reduzir a concentração tóxica para níveis razoáveis. Assim, os testes de ecotoxicidade juntamente com outras técnicas permitem combinar a quantificação da toxicidade com a identificação das substâncias tóxicas [8,11,43,49].

A *United States Environmental Protection Agency* (EPA ou USEPA) tem desenvolvido métodos de avaliação e identificação da toxicidade, mais conhecidos como métodos TIE (*Toxicity identification evaluation*), que envolvem três fases. A primeira fase consiste em testes de ecotoxicidade e tratamentos químicos, tendo como objetivo caracterizar a natureza físico-química das substâncias tóxicas e definir a classe a que pertencem. Os tratamentos químicos podem envolver modificação do pH, adição de agente quelante (por exemplo EDTA), extração em fase sólida com coluna de octadecil silano (C18), adição de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) e filtração. A realização de testes de ecotoxicidade antes e após aplicar o tratamento químico permite avaliar a eficácia deste [8,11,43,49].

A segunda fase permite identificar as substâncias cuja classe foi determinada na fase anterior, envolvendo técnicas analíticas específicas, tais como cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa ou espectrometria de massa [8,49].

A terceira fase envolve a realização de testes químicos e ecotoxicológicos adicionais, que permitem confirmar a caracterização e a identificação previamente realizadas nas duas fases anteriores [8].

4. Metodologias de ensaio

Os testes de ecotoxicidade têm ganho uma importância à escala global nos últimos anos, sendo atualmente considerados como parte integrante do programa de controlo da qualidade da água em vários países. Este tipo de teste é realizado na Europa e nos Estados Unidos, desde o início da década de 70, tendo os primeiros ensaios consistido na avaliação da mortalidade de algas e bactérias [6,9,48,55,60,67].

Após a década de 80 foram desenvolvidas várias metodologias de ensaio normalizadas, sendo as mais difundidas as que foram sugeridas pelas seguintes organizações internacionais: *American Society for Testing and Materials* (ASTM), *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), *Association of Analytical Communities* (AOAC) e *International Standard Organization* (ISO). Posteriormente alguns países optaram por desenvolver a sua própria metodologia, sendo o método utilizado nos Estados Unidos o sugerido pela *United States Environmental Protection Agency* (USEPA ou EPA), enquanto o utilizado na Alemanha foi proposto pelo *Deutsches Institut für Normung* (DIN). Estes métodos apresentam algumas diferenças entre si, nomeadamente no que diz respeito às espécies utilizadas, à composição dos meios de cultura, ao controlo do pH, aos métodos utilizados para determinar os resultados, bem como à forma de os exprimir [8,10,43,48,57,67,74].

Os procedimentos dos ensaios de ecotoxicidade devem aproximar-se o mais possível das condições naturais em que os organismos vivem, para que estes respondam com a maior fiabilidade possível, tendo sido essa a maior dificuldade encontrada no desenvolvimento deste tipo de testes. Para contornar este facto, os ensaios são normalmente realizados em laboratório, sob condições experimentais específicas e controladas, eliminando assim as variações que possam ocorrer em parâmetros ambientais como temperatura, substrato e iluminação. Contudo, o facto de os testes serem conduzidos com um número limitado de espécies e em condições estritamente controladas leva a que os resultados não incluam o efeito natural a que os organismos estão expostos localmente, o que consequentemente impossibilita determinar rigorosamente a concentração segura tóxica [5,8,9,48,57].

Existem diversos critérios que determinam a aplicabilidade de um modelo normalizado, os quais devem ser satisfeitos. Entre estes, é possível destacar a aceitação pela comunidade científica, pelo público e pela indústria em geral, o estudo de no mínimo cinco concentrações, a utilização de tempos de exposição realistas e a avaliação quantitativa através de métodos válidos como por exemplo análise estatística e a interpolação gráfica. Além disso, o teste deve ser sensível, económico, fácil de executar, reproduzível e útil do ponto de vista ambiental [11,57,61,64].

A metodologia desenvolvida pela EPA exige que as amostras para análise de metais sejam imediatamente conservadas após a colheita, enquanto a avaliação da presença de cloro residual total deve ser realizada imediatamente, ou o mais breve possível, tendo as amostras de ser previamente descloradas com tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) ou recorrendo a um sistema de filtração com carvão ativado. Quando o limite de deteção do bioensaio é suficientemente baixo e a concentração das substâncias tóxicas na amostra-teste é suficientemente elevada, a amostra deve ser utilizada na forma original. Porém, se a concentração das substâncias tóxicas for muito baixa e a sensibilidade do teste for muito afetada pelos sais nutrientes coexistentes, é necessário realizar previamente uma pré-concentração da amostra que garanta a preservação da sua integridade [43,55,57,84].

De forma a verificar eventuais interferências ao longo da realização do teste deve ser preparado um controlo negativo, o qual corresponde a uma amostra semelhante à avaliada, mas sem substância-teste. Deve ainda ser preparado adicionalmente um controlo positivo com uma substância tóxica de referência com efeito conhecido, que permita confirmar o alcance da sensibilidade expectável para os organismos utilizados e a reprodutibilidade dos resultados. Se a amostra tiver sido desclorada é também necessário incluir no ensaio um controlo de tiosulfato de sódio para avaliar a adequabilidade da concentração utilizada [11,57,70,84].

No sentido de controlar as condições básicas às quais os organismos-teste estão expostos, bem como auxiliar a interpretação de resultados, devem ser efetuadas análises físico-químicas complementares.

Nos últimos anos tem crescido a preocupação relativamente ao conhecimento do potencial risco de toxicidade de diversos produtos químicos, tendo surgido por exemplo a regulamentação da UE para o registo, avaliação, autorização e restrição de produtos químicos, designado por REACH. Os fabricantes de produtos químicos têm de apresentar às autoridades reguladoras informações ecotoxicológicas, de forma a apoiar o registo e/ou aprovação de novos produtos. A avaliação da toxicidade aquática com bactérias, algas, crustáceos e peixes deverá ser colocada em fichas de segurança e permitirá classificar os produtos químicos e avaliar os respetivos riscos ambientais [85].

A nível nacional o Decreto-Lei n.º 98/2010, de 11 de agosto, estabelece o regime a que obedece a classificação, embalagem e rotulagem das substâncias perigosas para a saúde humana ou para o ambiente, com vista à sua colocação no mercado, tendo sido revogado parcialmente pelo Decreto-Lei n.º 127/2013, de 30 de agosto, o qual estabelece o regime de emissões industriais aplicável à prevenção e ao controlo integrados da poluição, bem como as regras destinadas a evitar e ou reduzir as emissões para o ar, água e solo, e a produção de resíduos [48,86,87].

A descarga de águas residuais na Dinamarca exige a realização de ensaios com as seguintes espécies: bactéria luminescente *Vibrio fischeri*, alga verde *Rhaphidocellis subcapitata*, planta aquática *Lemna minor*, crustáceo *Daphnia magna* e peixe-zebra *Brachydanio rerio* [48].

Foi desenvolvido um projeto de demonstração Europeu, entre 2002 e 2005, para avaliação ecotoxicológica de águas residuais municipais e industriais da bacia do rio Trancão (Portugal), tendo efetuado uma bateria de ensaios com as seguintes espécies: bactéria *Vibrio fischeri*, alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, planta *Lemna minor*, e crustáceos *Thamnocephalus platyurus* e *Daphnia magna* [88,89].

De seguida vai ser realizada uma breve descrição dos vários tipos de testes de ecotoxicidade, dando maior ênfase aos testes com algas, pois este foi o tipo de bioensaio executado neste trabalho.

4.1. Bioensaios com bactérias

Os ensaios com bactérias são geralmente utilizados como método de triagem, tendo sido desenvolvida uma larga variedade de técnicas microbianas para avaliar os efeitos adversos resultantes da exposição a químicos tóxicos, sendo que a metodologia mais utilizada compreende a avaliação da inibição da bioluminescência da bactéria marinha *Vibrio fischeri* [43,55,60,65,74].

O teste de ecotoxicidade com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* foi desenvolvido por Beckman em 1977 e introduzido no mercado em 1979, designando-se pelo nome comercial Microtox®. Este ensaio é considerado simples, sensível, rápido, económico e reprodutível. Todavia, apresenta algumas limitações, tais como o facto de a bactéria ter pouco significado biológico e de a cor e o pH das amostras poderem influenciar a emissão de luz. Para além disso, o teste é feito em meio salino, o que interfere por exemplo com a solubilidade dos metais. Estes motivos levam a que por vezes seja necessário realizar um pré-tratamento que reduza o efeito de estimulação das substâncias interferentes, como por exemplo sais nutrientes, que podem promover a respiração de bactérias luminescentes, e conseqüentemente simular a emissão de luz [8,48,55,60,74].

O teste Microtox® tem sido normalizado e comercializado em diversas versões, estando os protocolos de ensaio disponíveis em diferentes normas, destacando-se as seguintes: ISO 11348, ASTM D 5660-96, DIN 38412-34 e AFNOR T90-320. O ensaio consiste na exposição da bactéria luminescente *Vibrio fischeri* a diferentes concentrações de agente tóxico, durante 15 a 30 minutos, sendo portanto avaliada a toxicidade aguda,

podendo também ser estimada a toxicidade crônica, pois o tempo de exposição das bactérias luminescentes depende das substâncias a avaliar. Não obstante, existe pouca informação disponível relativamente ao tempo de exposição utilizado nos ensaios. Os resultados obtidos são comparados com a luminescência emitida na amostra controlo negativo, sendo avaliada a relação dose-resposta [8,43,48,55,60;65].

4.2. Bioensaios com algas

Os primeiros estudos realizados com algas foram desenvolvidos por Bringmann e Kühn em 1956, tendo sido divulgado em 1969 nos Estados Unidos um método provisório de ensaio com algas, designado por *provisional Algal Assay Procedure*. Após dois anos foi publicado o primeiro método normalizado de análise com algas, o qual foi denominado por *Algal Assay Procedure: Bottle Test*, tendo posteriormente diversas organizações internacionais desenvolvido outros procedimentos. Os métodos normalizados propostos apresentam diferenças entre si, nomeadamente no que diz respeito às espécies de algas utilizadas, à composição dos meios de cultura, ao controlo do pH, aos métodos utilizados para determinar a concentração de algas, bem como à forma de exprimir os resultados [48,57].

O princípio de todos os métodos normalizados consiste em expor uma suspensão de algas com densidade conhecida, juntamente com um meio nutriente, a diferentes concentrações de água residual ou agente químico. Após um período de tempo estabelecido procede-se à avaliação da taxa de crescimento da alga, sendo que a comparação com o crescimento de uma cultura numa solução controlo isenta de agentes tóxicos, permite avaliar a taxa de inibição de crescimento provocada pela toxicidade do meio aquático. Os ensaios realizados com algas apresentam elevada sensibilidade e são simples, rápidos e de baixo custo [43,52,60,64,68,77].

Os fatores ambientais devem ser rigorosamente controlados durante o teste, pois podem levar à inibição do crescimento das algas, que será facilmente confundida com a manifestação da toxicidade. Desta forma, os ensaios de ecotoxicidade devem decorrer em condições controladas de temperatura, intensidade de luminosidade e pH. É de salientar que a cor das amostras pode funcionar como um interferente para as algas, pois as amostras sendo coradas absorvem parte da luz disponível, a qual é essencial para o crescimento das algas [3,8].

Um dos métodos mais difundidos foi apresentado pela OECD, o qual é simples e económico, sendo necessário utilizar um aparelho de cultura com recipientes de vidro ou outro material quimicamente inerte, com volume adequado e sob agitação constante, que

permita manter as culturas a uma temperatura entre 21 e 24 °C, controlada a ± 2 °C, podendo ser apropriado utilizar temperaturas mais elevadas para por exemplo espécies tropicais. O teste consiste na exposição de microalgas de água doce ou cianobactérias em crescimento exponencial, à substância tóxica em estudo, durante normalmente um período de 72 horas. Uma vez que as algas se multiplicam até três vezes por dia, o teste pode abranger várias gerações de organismos, tratando-se por isso de um teste crônico. O ensaio deve decorrer em regime estático sem renovação, devendo as algas verdes receber luz fluorescente contínua branca fria (tipo luz solar) com uma gama de intensidade de 60 a 120 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (4440 – 8880 lux). Os ensaios devem ser realizados em triplicado e devem incluir soluções de controlo positivo e negativo, e no mínimo cinco soluções com diferentes concentrações da substância em estudo, que devem cobrir preferencialmente a gama que provoca 5 a 75% de inibição na taxa de crescimento algal. Para o teste ser válido é necessário garantir a satisfação de alguns critérios, sendo de destacar a sensibilidade ótima das algas que é alcançada com a adaptação da mesma às condições-teste, e a garantia do crescimento exponencial. Desta forma, é aconselhável inocular previamente a cultura com solução nutriente e sob luz fluorescente durante 2 a 4 dias. Relativamente aos meios de cultura, são recomendados dois meios alternativos com diferente pH e capacidade tampão: meio OECD e meio AAP (meio EPA). A modificação destes meios pode ser benéfica na avaliação de, por exemplo, amostras com metais, agentes quelantes ou com diferentes valores de pH, não devendo a variação deste parâmetro no decorrer do teste exceder uma amplitude de 1,5 ^[52,57,64,68].

A biomassa inicial deve ser idêntica em todas as culturas do teste, devendo ser suficientemente baixa para permitir um crescimento exponencial ao longo de todo o período de incubação, sem que ocorra o esgotamento de nutrientes. Este facto levou ao estabelecimento de critérios de aceitação, sendo recomendado que a biomassa inicial não exceda os 0,5 mg/L de peso seco, devendo o fator de aumento na cultura de controlo após um período de teste de 72 horas ser de pelo menos 16, o que corresponde a uma taxa de crescimento específica de 0,92 dia^{-1} . Para as espécies mais frequentemente utilizadas: *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Desmodesmus subspicatus*, *Navicula pelliculosa*, *Anabaena flos-aquae* e *Synechococcus leopoliensis*, a taxa de crescimento é substancialmente superior. No entanto, para espécies com taxa de crescimento inferior, o período de teste deve ser alargado de forma a obter um fator de aumento de densidade celular de 16 ^[64].

Existem várias substâncias inibidoras de referência que podem ser utilizadas para preparar as soluções de controlo positivo, sendo as seguintes as mais utilizadas: dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cádmio (CdCl_2), sulfato de cobre (CuSO_4), dodecil sulfato de sódio (SDS;

$\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$) e 3,5-diclorofenol ($\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2\text{O}$) [57,64].

A biomassa deve ser medida pelo menos diariamente, devendo no fim do teste ser realizada uma observação microscópica da cultura para confirmar a aparência normal e saudável das algas, ou detetar qualquer aparência anormal [64].

A biomassa algal corresponde ao peso seco de matéria viva presente na solução-teste, sendo expressa por $\text{mg}_{\text{algas}}/\text{L}_{\text{solução-teste}}$. Devido à dificuldade em medir o peso seco, é frequente realizar medidas alternativas recorrendo ao microscópio com câmara de contagem manual, ao contador eletrónico de partículas ou ao citómetro de fluxo. É também possível recorrer a outras técnicas, como por exemplo espectrofotometria, colorimetria, fluorimetria ou densitometria ótica. Contudo, é de salientar que amostras com cor acentuada podem apresentar fenómenos de interferência na avaliação com este tipo de métodos óticos. A medida mais adequada corresponde à que apresenta melhor correlação com a biomassa durante todo o intervalo de teste, devendo ser conhecido o fator de conversão entre o peso seco e a medida alternativa. É de realçar que a utilização de diferentes medidas de avaliação do crescimento de algas pode conduzir a diferentes respostas de toxicidade, não podendo por isso os valores ser numericamente comparados [8,48,64].

No que se refere à forma de exprimir os resultados, estes podem ser expressos pela taxa de crescimento específica média ou pelo rendimento, sendo a utilização da taxa de crescimento específica média cientificamente preferível, enquanto a resposta baseada no rendimento é uma exigência regulamentar de alguns países. A taxa de crescimento específica média diária é calculada com base no aumento logarítmico da biomassa durante o período de exposição, sendo o rendimento definido pela área sob a curva de crescimento que corresponde à amplitude entre a biomassa final e inicial [64].

A relação entre a concentração que provocou inibição a 50% dos organismos (C_{50}) e a taxa de crescimento específica média ou o rendimento registado numa série de soluções-teste é expressa através do parâmetro EC_{50} . De forma a distinguir os diferentes resultados é recomendado que os valores com base na taxa de crescimento específica média sejam expressos por E_rC_{50} , devendo os valores calculados através do rendimento ser especificados por E_yC_{50} . Os resultados obtidos com as duas variáveis de resposta não são comparáveis, sendo geralmente superiores os valores baseados na taxa de crescimento específica média [64].

Adicionalmente, podem ser determinados estatisticamente os valores de CEO e CENO, recorrendo à técnica de análise de variância ANOVA [64].

A EPA apresentou um método de avaliação da toxicidade crónica com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, o qual foi também bastante difundido. Este teste abrange a exposição do organismo-teste à solução controlo negativo e a pelo menos

cinco soluções com diferentes concentrações da substância em estudo durante um período de 96 horas, decorrendo em regime estático sem renovação, à temperatura de 25 ± 1 °C controlada a ± 3 °C, e recebendo luz fluorescente contínua branca fria com intensidade de $86 \pm 8,6$ $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (4306 lux) [57].

Os bioensaios com algas têm sido aplicados em diversas situações, desde testes realizados com uma única substância até misturas complexas como as que se encontram em efluentes industriais.

4.3. Bioensaios com crustáceos

Os testes de ecotoxicidade com dafnídeos, particularmente a *Daphnia magna*, são largamente utilizados a nível internacional desde 1928 [7,10,12,79].

Os ensaios consistem em adicionar cinco dáfrias a cada recipiente contendo o meio de cultura e concentrações crescentes do tóxico a testar, sendo os organismos incubados sob condições controladas durante um período de 24 a 48 horas e na presença de luz. Devido a ser utilizado um reduzido número de organismos, o teste é usualmente realizado em triplicado. Quando se trata de efluentes e amostras ambientais, são normalmente avaliadas concentrações que permitam obter resultados de inibição distribuídos entre 0 e 100%. Devido à dificuldade em visualizar a morte dos organismos, o parâmetro considerado neste teste é a perda de mobilidade dos indivíduos, que pode ser observada em sistemas de câmeras de vídeo e expressa pela CE_{50} . Pode também ser realizado um ensaio de reprodução expondo dáfrias durante 14 dias, em que é determinado o aumento do número de indivíduos, a partir do qual é possível estimar o efeito tóxico na reprodução [11,48,68,90].

Uma substância de referência muitas vezes utilizada neste tipo de ensaios é o sulfato de zinco (ZnSO_4), mas embora o zinco seja um elemento essencial para a regulação interna dos crustáceos, pode ser tóxico a níveis relativamente baixos, comprometendo as funções fisiológicas, tais como respiração, regulação osmótica, processos reprodutivos e aspetos comportamentais [70].

A EPA recomenda um método para estimar a toxicidade crónica com a espécie *Ceriodaphnia dubia*, o qual abrange ensaios com um controlo negativo e pelo menos cinco concentrações da substância em estudo, num sistema de renovação estático durante 7 dias. O teste deve decorrer à temperatura de 25 ± 1 °C, com iluminação ambiente tipo laboratório, intensidade na gama de 10 a 20 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, tendo como parâmetros de avaliação a sobrevivência e a reprodução [57].

Os ensaios com *Artemia salina* apresentam como vantagens o facto de serem

rápidos, simples, de baixo custo, requererem pequenos volumes de amostra e estarem em conformidade com as diretrizes éticas de animais em muitos países. As condições ótimas de crescimento deste tipo de bioindicador são temperatura de 30 ± 5 °C, salinidade de 35‰, e pH ligeiramente alcalino de cerca de 8, sendo que o teste de toxicidade consiste na incubação em água salgada durante 48 horas e na avaliação da perda de capacidade de movimentação das larvas ^[60,68;90].

Existem protocolos internacionais que estabelecem normas para o uso de copépodes marinhos larvais ou nauplios da espécie *Tisbe biminiensis*, sendo os testes normalizados amplamente utilizados. Porém, é de referir, que estes métodos são demasiado trabalhosos quando envolvem um elevado número de amostras, pois a transferência dos organismos para cada poço é realizada individualmente ^[70].

4.4. Bioensaios com peixes

Os peixes representam uma componente indispensável na avaliação da toxicidade integrada de ambientes aquáticos, tendo a sua notoriedade sido demonstrada em diversos testes de toxicidade nas diretrizes da OECD ^[7].

Os peixes são expostos a diversas concentrações durante um determinado período de tempo, sendo a letalidade o parâmetro avaliado nos testes rotineiros de toxicidade aguda, podendo também ser avaliados outros parâmetros comportamentais através de câmeras de vídeo, tais como velocidade média, movimentos e número de rotações ^[11,60].

Este tipo de ensaios possui boa sensibilidade, no entanto, tem como desvantagens o facto de apresentarem problemas de normalização, e de necessitarem de equipamento especializado e de longos períodos de tempo, o que torna o teste dispendioso e moroso ^[57,60].

A EPA recomenda um método para estimar a toxicidade crónica com a espécie *Pimephales promelas*, o qual se baseia em ensaios com um controlo negativo e pelo menos cinco concentrações da substância em estudo, num sistema de renovação estático durante 7 dias. O teste deve decorrer à temperatura de 25 ± 1 °C e com iluminação ambiente tipo laboratório, intensidade entre 10 e 20 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, tendo como parâmetros de avaliação a sobrevivência e o crescimento ^[57].

5. Ecotoxicidade de produtos farmacêuticos

Os produtos farmacêuticos desempenham um papel fundamental no tratamento e prevenção de doenças dos seres humanos e animais, estando disponíveis em diversas classes, tais como, antibióticos, anti-inflamatórios, analgésicos, compostos neuroativos, contraceptivos, entre outros. A sua utilização tem aumentado de forma descontrolada nos últimos anos, e devido à sua complexa degradabilidade não são removidos pelos tratamentos convencionais e entram continuamente no ambiente, sendo considerados poluentes persistentes ^[91-94].

Os fármacos possuem propriedades intrínsecas bioativas, pelo que a exposição prolongada destes e/ou dos produtos resultantes das reações metabólicas, mesmo em baixas concentrações, pode conduzir a efeitos adversos para os seres humanos e para os ecossistemas, tais como desregulação endócrina, reações de resistência a medicamentos, genotoxicidade, carcinogenicidade, e efeitos na reprodução e no desenvolvimento de fetos. Em geral, os ecossistemas estão em maior risco do que os seres humanos devido a estarem expostos a concentrações mais elevadas ^[94-97].

A entrada dos fármacos no ambiente deve-se à excreção do organismo (após ingestão) e à inadequada eliminação das substâncias indesejáveis ou fora de validade. Assim, após a sua ação, os compostos não absorvidos pelo organismo são expelidos através da urina e/ou fezes, na forma inalterada ou em metabólitos ativos que podem ser ainda mais nocivos do que os compostos originais. Estas substâncias são lançadas nas águas residuais, sendo posteriormente direcionadas através de redes de coletores para as Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR). Para além disso, os compostos não desejáveis ou fora de validade são frequentemente eliminados de forma desapropriada, juntamente com os efluentes que são conduzidos para as ETAR, ou através dos resíduos sólidos que são depositados em aterros sanitários, produzindo lixiviados contaminados que podem atingir águas subterrâneas ^[94,98-102].

Apenas as ETAR com tratamento terciário por ozonização, carvão ativado ou lâmpadas de raios ultravioleta têm capacidade para remover completamente os produtos farmacêuticos das águas residuais. Devido ao facto de estes métodos representarem um aumento significativo do custo de tratamento, demasiado elevados em alguns casos, a maioria das ETAR possui apenas tratamento secundário. Assim, os produtos farmacêuticos não são degradados completamente, permanecendo nas águas residuais tratadas que são posteriormente descarregadas em águas superficiais ou solos. Desta forma, os fármacos entram continuamente no ambiente, sendo as ETAR as principais responsáveis. A sua concentração no ambiente depende da eficiência das ETAR e das características dos fármacos, tais como solubilidade, estabilidade química, biodegradação,

biotransformação, bioacumulação e tempo de semi-vida ^[94,95,97,98,101,103,104].

O surgimento de compostos farmacêuticos no meio ambiente é alarmante, sendo necessário identificar e quantificar estes contaminantes. Embora o estudo se tenha iniciado na década de 70 nos Estados Unidos da América (EUA), este alcançou maior progresso apenas em meados dos anos 90 com o desenvolvimento de técnicas analíticas com limites de detecção de µg/L a ng/L, tais como cromatografia e espectrometria de massa. Atualmente, é evidente a ampla disseminação de fármacos, tendo sido detetados em águas residuais, de superfície (rios, lagos, ribeiras, estuários e mares), subterrâneas e potáveis, solos e sedimentos. A maioria dos estudos analisa a ecotoxicidade de um único composto farmacêutico, no entanto, é de referir que os fármacos estão normalmente presentes nos ecossistemas sob a forma de misturas complexas, e os vários constituintes podem ter diferentes modos de ação tóxica, podendo ocorrer o efeito sinérgico em que a toxicidade da mistura é superior à adição da toxicidade dos seus constituintes, ou o efeito antagónico em que a toxicidade da mistura é inferior à soma da toxicidade dos componentes isolados. Nos últimos anos tem-se verificado um crescimento na deteção, o qual foi associado ao aumento global da taxa de consumo de medicamentos ^[95,99,101, 103-109].

5.1. Enquadramento legal

A preocupação com o potencial tóxico que diversos produtos químicos podem provocar no ambiente levou ao desenvolvimento de várias diretrizes para a sua avaliação ambiental.

Atualmente, o ordenamento jurídico da UE e dos EUA exige a avaliação de risco ambiental como pré-requisito para obter a autorização para comercializar novos produtos farmacêuticos. A Diretiva 92/18/CEE da Comissão, de 20 de março introduziu pela primeira vez a exigência da avaliação de risco ambiental relativa aos produtos farmacêuticos veterinários, tendo a *European Medicines Agency* (EMA) estabelecido diretrizes para essa avaliação. Posteriormente, a Comissão Europeia estendeu a avaliação aos produtos farmacêuticos para uso humano, publicando a Diretiva 2001/83/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 6 de novembro, a qual foi posteriormente alterada pela Diretiva 2004/27/CE, de 31 de março. A avaliação é dividida em duas etapas, sendo na fase I estimada a exposição ambiental dos produtos farmacêuticos ou metabolitos, e se a concentração ambiental for igual ou superior ao valor limite de segurança de 0,01 µg/L serão realizados estudos de fase II, de forma a avaliar o destino e os efeitos no ambiente. Nos EUA, as questões relativas aos fármacos

no ambiente são reguladas pela *Food and Drug Administration* (FDA), sendo exigida a avaliação se a concentração ambiental no ponto de entrada for superior a 1 µg/L. Contudo, existem poucos dados relativos à ecotoxicidade dos compostos que foram introduzidos no mercado antes de as diretrizes terem entrado em vigor ^[99,102,105,110–112].

A Diretiva 93/67/CEE, de 20 de julho, classifica as substâncias de acordo com o seu valor de CE₅₀ em diferentes classes: <1 mg/L (muito tóxico para os organismos aquáticos); 1 – 10 mg/L (tóxico para os organismos aquáticos) e 10 – 100 mg/L (nocivo para os organismos aquáticos), não tendo classificação substâncias com valor acima de 100 mg/L ^[113,114].

5.2. Ibuprofeno

O ibuprofeno (ácido 2-(4-isobutilfenil)propanóico) (Figura 5.1) é uma substância farmacêutica ativa pertencente ao grupo de anti-inflamatórios não esteróides (AINE), sendo também antipirético e analgésico, utilizado para combater a inflamação, a febre e o alívio temporário de dores de leve a moderada intensidade ^[101,107].

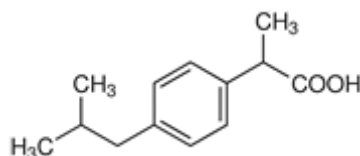


Figura 5.1 – Estrutura molecular do ibuprofeno ^[115].

Do ponto de vista farmacológico, é um ácido fraco que atua por inibição não-seletiva das isoformas enzimáticas 1 e 2 da cicloxigenase (COX), que catalisam a formação de prostaglandinas e tromboxano a partir do ácido araquidônico. Desta forma, a inibição da COX representa o passo limitante da velocidade de formação de prostaglandinas que se encontram no local da inflamação. A enzima COX-1 manifesta-se em muitos tipos de tecidos, incluindo os do trato gastrointestinal em que forma uma citoproteção no sistema gástrico, levando a sua inibição à formação de úlceras. Por outro lado, a COX-2 está presente num menor tipo de células, funcionando como mediador chave na cascata da inflamação e resposta da dor e da febre ^[97,105,107,109,116].

Esta substância foi sintetizada pela primeira vez em 1960 no Reino Unido, tendo sido comercializada no mesmo país apenas em 1969, e só em 1974 nos EUA. Atualmente é vendido em todo o mundo sem necessitar de prescrição médica, sendo o

terceiro fármaco mais consumido, possuindo uma produção global anual da ordem das quilotoneladas. Este fármaco pertence à lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial de Saúde (OMS), e possui uma dose terapêutica relativamente elevada (600 – 1200 mg/d). De acordo com os últimos dados disponibilizados pela Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde (INFARMED), a taxa de consumo de ibuprofeno aumentou durante a última década, tendo a sua posição na lista de ingredientes farmacêuticos ativos mais vendidos sido alterada da 15ª para a 8ª, com mais de 2 milhões de prescrições em 2009 [91, 92,101,107,109,116–118].

Após a administração, 70 a 80% da dose terapêutica é excretada com a urina e fezes, na forma de uma mistura do composto original livre inalterado com metabólitos. Os principais metabólitos de ibuprofeno nos seres humanos são o carboxi-ibuprofeno e o 2-hidroxi-ibuprofeno, podendo também estar presentes em menor concentração 1-hidroxi-ibuprofeno, 3-hidroxi-ibuprofeno e vários ácidos glucorónicos conjugados com os vários metabólitos. Assim, do ibuprofeno ingerido apenas cerca de 15% é excretado na forma inalterada, sendo 43% metabolizado em carboxi-ibuprofeno e 26% em 2-hidroxi-ibuprofeno. Apesar de o carboxi-ibuprofeno ser o mais excretado, este é mais facilmente biodegradado, e por isso, o 2-hidroxi-ibuprofeno é o mais persistente no ambiente [109,119,120].

Na Tabela 5.1 encontram-se algumas propriedades físico-químicas do ibuprofeno, tais como fórmula química, peso molecular, solubilidade em água, constante de dissociação (pK_a), coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$), coeficiente de adsorção baseado no carbono orgânico ($\log K_{oc}$) e coeficiente de distribuição sólido-água ($\log K_d$) [103,121].

Tabela 5.1 – Propriedades físico-químicas do ibuprofeno [adaptado de 103,121].

Fórmula química	$C_{13}H_{18}O_2$
Peso molecular	206,29 g/mol
Solubilidade em água (25 °C)	21 mg/L
pK_a	4,5 – 5,2
$\log K_{ow}$	4
$\log K_{oc}$	1,82 – 3,12
$\log K_d$	1 – 1,78

O ibuprofeno tem baixa solubilidade em água, podendo esta ser aumentada em meio tamponado. Este facto foi confirmado com um teste que permitiu dissolver 38 mg/L de ibuprofeno. O elevado peso molecular juntamente com o alto log K_{ow} indicam uma fácil adsorção a sólidos suspensos e sedimentos quando libertado em água [103].

De acordo com a literatura, a maioria das ETAR apenas permite remover 75 a 90% do ibuprofeno, sendo possível alcançar cerca de 99% com tecnologias avançadas [95,101,107].

Apresenta-se de seguida, na Tabela 5.2, uma síntese dos trabalhos de revisão publicados envolvendo a deteção de ibuprofeno e seus metabolitos em diferentes ambientes aquáticos, e na Tabela 5.3 um resumo dos estudos de avaliação da ecotoxicidade do ibuprofeno utilizando diferentes organismos representativos e espécies [103,105].

Tabela 5.2 – Exemplos de concentrações de ibuprofeno e dos seus metabolitos avaliados em diferentes ambientes aquáticos [adaptado 103,105]

Composto	Número CAS	Amostra	País	Procedimento analítico	Limite de detecção (ng/L)	Concentração registada (ng/L)	Referência
Ibuprofeno	15687-27-1	água nacional	França	LC-MS/MS	10 (limite de quantificação)	19	[104]
		água do rio Yangtze	China	SPE-UPLC-MS/MS	0,15-9,1 (limite de quantificação)	81,8-99,3	[122]
		água do rio Tiaoxi	China	SPE-LC-MS/MS	-	31 - 41,2	[123]
		água do rio Jinxi				30,8-89,3	
		água subterrânea	Canadá	SPE-LC-MS/MS	-	3,97	[124]
		efluente de ETAR	Coreia	SPE-LC-MS/MS	-	1600	[125]
		afluente de ETAR	Espanha	SPE-HPLC	-	12900-50600	[126]
		efluente de ETAR				1050-8000	
		afluente da ETAR de Eskilstuna	Suécia	SPE-LC-MS/MS	-	1200	[127]
		efluente da ETAR de Eskilstuna				740	
		afluente da ETAR de Nynäshamn				1500	
		efluente da ETAR de Nynäshamn				290	
		afluente da ETAR de Oxelösund				660	
		efluente da ETAR de Oxelösund				80	
		afluente da ETAR de Trosa				1400	
		efluente da ETAR de Trosa				1300	
		afluente de ETAR	Espanha	SPE-UPLC-MS/MS	-	7000-13700	[120]
		efluente de ETAR				500-1900	
		água de rio				200-800	
		água de rio	Canadá	SPE-LC-MS/MS	0,5	270-2700	[128]
água subterrânea	Espanha	SPE-LC-MS	-	395	[129]		
afluente de ETAR	Taiwan	SPE-HPLC-MS/MS	-	711-17933	[130]		
efluente de ETAR				313-3777			

Tabela 5.2 (Continuação)

Composto	Número CAS	Amostra	País	Procedimento analítico	Limite de detecção (ng/L)	Concentração registrada (ng/L)	Referência
Ibuprofeno	15687-27-2	efluente hospitalar	Taiwan	SPE-HPLC-MS/MS	25	119	[130]
		efluente da indústria farmacêutica				45875	
		água do rio Mankyung	Coreia do Sul	SPE-LC-MS/MS	5	<5-414(±13)	[131]
		afluente de ETAR	Luxemburgo	SPE-LC-MS/MS	0,3	82-3080	[132]
		efluente de ETAR				3-359	
		água do rio Alzette				10-295	
		água do rio Mess				9-2383	
		efluente de ETAR	Espanha	SPE-LC-QqLIT-MS	13 (limite de quantificação)	100-340	[133]
		efluente de ETAR	Balcãs	SPE-LC-MS/MS	12	LD-11900	[134]
		água subterrânea	USA	SPE-LC-MS	18	3110	[135]
		efluente de ETAR	Coreia do Sul	SPE-LC-MS/MS	1,0	10-137	[131]
		água superficial				11-38	
		água potável				<1,0	
		afluente de ETAR	Reino Unido	SPE-HPLC-MS/MS	20	7741-33764	[136]
		efluente de ETAR				1979-4239	
		água do rio Tyne				144-2370	
		afluente de ETAR	Espanha	SPE-HPLC-MS/MS	12	37-860	[137]
		efluente de ETAR	Bélgica			18-1860	
		água de rio	Alemanha			60-152	
		água potável	Eslovênia			<12	
efluente hospitalar	Espanha	SPE-HPLC-MS/MS	31	1500-151000	[138]		
água do rio Po	Itália	SPE-HPLC-MS/MS	4,2 (limite de quantificação)	ND-9,76	[139]		
água do rio Lambro				78,5			

Tabela 5.2 (Continuação)

Composto	Número CAS	Amostra	País	Procedimento analítico	Limite de detecção (ng/L)	Concentração registrada (ng/L)	Referência
Ibuprofeno	15687-27-2	efluente de ETAR	Reino Unido	SPE-HPLC-MS/MS	20	1700-3800	[140]
		água superficial				<20	
		afluente de ETAR	Espanha	SPE-GC-MS	23	34000 - 168000	[141]
		efluente de ETAR				240 - 28000	
		efluente de ETAR	Canadá	SPE-GC-MS	0,8	2235,2 - 6718,3	[142]
		afluente de ETAR	Japão	SPE-GC-MS	1 (limite de quantificação)	407-1130	[143]
		efluente de ETAR				1,41-177	
		água do rio Somes	Roménia	SPE-GC-MS	30 (limite quantificação)	<30 - 115,2 ($\pm 20,7$)	[144]
		afluente de ETAR	Suíça	SPE-GC-MS	8	1750 - 4500	[145]
		efluente de ETAR				100 - 1200	
		afluente de ETAR	Canadá	SPE-GC-MS	10	4100 - 10210	[146]
		efluente de ETAR				110 - 2170	
		afluente de ETAR	Suécia	SPE-GC-MS	-	3590	[147]
		efluente de ETAR				150	
		água do rio Hölje				10 - 220	
		água do rio Elber	Alemanha	SPE-GC-MS	0,05 (limite de quantificação)	8,7-32	[148]
		água do lago Alster				4,9	
		efluente de ETAR	USA	SPE-GC-MS	10	18 ($\pm 14\%$)	[149]
		água do rio Paraíba do sul	Brasil	SPE-GC-MS	10	<10	[150]
		água potável				<10	

Tabela 5.2 (Continuação)

Composto	Número CAS	Amostra	País	Procedimento analítico	Limite de detecção (ng/L)	Concentração registada (ng/L)	Referência
Carboxi- -ibuprofeno	15935-54-3	afluente de ETAR	Espanha	SPE-UPLC- MS/MS	-	18400-38400	[120]
		efluente de ETAR				700-10700	
		água de rio				2000-3900	
		afluente de ETAR	Suécia	SPE-GC-MS	-	10750	[147]
		efluente de ETAR				430	
		água do rio Høje				230-680	
		água do rio Elber	Alemanha	SPE-GC-MS	0,21	11-32	[148]
água do lago Alster	9,5						
2-Hidroxi- -ibuprofeno	51146-55-5	afluente de ETAR	Espanha	SPE-UPLC- MS/MS	-	1200-94000	[120]
		efluente de ETAR				400-5900	
		água de rio				1500-3000	
		afluente de ETAR	Suécia	SPE-GC-MS	-	990	[147]
		efluente de ETAR				50	
		água do rio Høje				20-60	
		água do rio Elber	Alemanha	SPE-GC-MS	0,38	32-101	[148]
água do lago Alster	18						

Tabela 5.3 – Exemplos de avaliação da ecotoxicidade do ibuprofeno [adaptado de 105]

Composto	Número CAS	Taxonomia	Espécie	Parâmetro ecotoxicológico	Dados ecotoxicológicos	Referência
Ibuprofeno	15687-27-2	alga	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	CE ₅₀ (96h) (inibição do crescimento)	2,3 mg/L	[93]
		alga	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	CE ₅₀ (inibição do crescimento)	342,2 mg/L	[151]
		alga	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	CE ₅₀ (inibição do crescimento)	315 mg/L	[114]
		planta aquática	<i>Lemna minor</i>	CE ₅₀ (7 d) (inibição do crescimento)	4,01 mg/L	[96]
		planta aquática	<i>Lemna minor</i>	CE ₅₀ (7 d) (inibição do crescimento)	22 mg/L	[114]
		crustáceo	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	CL ₅₀ (24 h) (mortalidade)	19,59 mg/L	[131]
		crustáceo	<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀ (48 h) (imobilização)	10 - 100 mg/L	[152]
		crustáceo	<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀ (14 d) (reprodução)	13,4 mg/L	[152]
		crustáceo	<i>Daphnia magna</i>	CENO (14 d) (sobrevivência)	20 mg/L	[152]
		crustáceo	<i>Daphnia magna</i>	CEO (14 d) (sobrevivência)	80 mg/L	[152]
		crustáceo	<i>Daphnia magna</i>	CEO (14 d) (crescimento populacional)	20 mg/L	[152]
		crustáceo	<i>Gammarus pulex</i>	CEO (comportamento)	10 ng/L	[153]
		crustáceo	<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀ (48 h) (imobilização)	101,2 mg/L	[151]
		crustáceo	<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀ (48 h) (imobilização)	108 mg/L	[114]
		molusco	<i>Planorbis carinatus</i>	CL ₅₀ (72 h) (sobrevivência)	17,1 mg/L	[154]
		molusco	<i>Planorbis carinatus</i>	CENO (21 d) (sobrevivência)	5,36 mg/L	[154]
		molusco	<i>Planorbis carinatus</i>	CENO (21 d) (crescimento)	1,02 mg/L	[154]
		molusco	<i>Planorbis carinatus</i>	CEO (21 d) (crescimento)	2,43 mg/L	[154]
		molusco	<i>Planorbis carinatus</i>	CENO (21 d) (reprodução)	2,43 mg/L	[154]
		cnidário	<i>Hydra attenuata</i>	CL ₅₀ (96 h) (morfologia)	22,36 mg/L	[155]
		cnidário	<i>Hydra attenuata</i>	CE ₅₀ (96 h) (morfologia)	1,65 mg/L	[155]
		cnidário	<i>Hydra attenuata</i>	CEO (96 h) (morfologia)	1 mg/L	[155]
		cnidário	<i>Hydra attenuata</i>	CENO (96 h) (morfologia)	0,1 mg/L	[155]
cnidário	<i>Hydra attenuata</i>	CE ₅₀ (96 h) (alimentação)	3,85 mg/L	[155]		
peixe	<i>Oryzias latipes</i>	CL ₅₀ (96 h) (mortalidade)	>100 mg/L	[154]		

6. Materiais e métodos

A ecotoxicidade do ibuprofeno e seus metabolitos foi determinada através do teste de inibição para algas, estabelecido no Regulamento (CE) n.º 440/2008 da Comissão de 30 de maio de 2008 [13]. A escolha deste tipo de método recaiu sobre o facto de ser considerado apropriado para a realização deste estudo, consistindo na exposição de diversas gerações de organismos-teste, em condições definidas, a diferentes concentrações de substância-teste, e na avaliação dos efeitos sobre o crescimento. De modo a evitar contaminações com microrganismos, utilizaram-se técnicas assépticas recorrendo a uma câmara de fluxo laminar (Faster, modelo two 30, Itália) e à esterilização a 122 °C durante 15 min em autoclave (AJC, modelo uniclave 88, Portugal).

6.1. Reagentes e solventes

Nos ensaios de ecotoxicidade foi utilizada água desionizada (15,0 MΩ.cm; Millipore modelo Elix 3, Molsheim, França).

A preparação do meio de cultura envolveu a utilização de várias substâncias, tais como cloreto de magnésio hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), nitrato de sódio ($NaNO_3$), hidrogenofosfato de dipotássio (K_2HPO_4) e hidrogeno-carbonato de sódio ($NaHCO_3$), que foram adquiridos à Riedel-de-Haën (Seelze, Alemanha). Os compostos cloreto de cálcio dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), cloreto de zinco ($ZnCl_2$), cloreto de ferro hexahidratado ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) e molibdato de sódio dihidratado ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) foram obtidos na Merck (Darmstadt, Alemanha), e o ácido bórico (H_3BO_3) na Scharlab S.L. (Sentmenat, Espanha). O cloreto de manganês (II) tetrahidratado ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) foi adquirido à Fluka (Steinheim, Alemanha), tendo o cloreto de cobalto hexahidratado ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$), o cloreto de cobre dihidratado ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$), o ácido etilenodiaminotetraacético sal disódio dihidratado ($Na_2EDTA \cdot 2H_2O$) e o selenato de sódio (Na_2SeO_4) sido obtidos na Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

Nos ensaios de ecotoxicidade utilizou-se dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), ibuprofeno ($C_{13}H_{18}O_2$) (pureza $\geq 98\%$), carboxi-ibuprofeno ($C_{13}H_{16}O_4$) (pureza $\geq 99,4\%$) e 2-hidroxi-ibuprofeno ($C_{13}H_{18}O_3$) (pureza $\geq 99,1\%$), que foram adquiridos à Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

Na análise cromatográfica foi utilizada água ultra-pura (18,2 MΩ.cm; Millipore, modelo simplicity 185; Molsheim, França), ácido acético glacial (pureza $\geq 99,7\%$; Carbo Erba, Rodano, Itália) e acetonitrilo LiChrosolv® (pureza $\geq 99,9\%$, Merck, Darmstadt, Alemanha). Os eluentes foram previamente filtrados por um filtro de membrana de nylon

com 0,22 µm de diâmetro de poro (Membrane-Solutions), num sistema de filtração (Teknokroma) auxiliado por uma bomba de vácuo (Drinko, modelo D-95, Barcelona, Espanha). Posteriormente foram desgaseificados durante 15 minutos num banho de ultrassons (Bandelin, modelo Sonorex digital 10P, Berlim, Alemanha).

6.2. Organismos-teste

Os organismos utilizados nos testes foram as algas verdes unicelulares de água doce *Pseudokirchneriella subcapitata* CCAP 278/4 e *Chlorella vulgaris* estirpe 211.

A cultura *stock* da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* foi fornecida pela Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, tendo a cultura de *Chlorella vulgaris* sido facultada pela Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa. De forma a adaptar as algas às condições do teste e assegurar que se encontravam na fase de crescimento exponencial quando fossem inoculadas nas soluções-teste, procedeu-se à transferência numa câmara de fluxo laminar de cerca de 100 mL de cultura *stock* e 1 L de meio nutriente (o meio de cultura será descrito no subcapítulo seguinte) para um balão previamente autoclavado. As culturas de algas (Figura 6.1) foram mantidas durante cerca de 4 dias nas condições recomendadas no Regulamento (CE) n.º 440/2008 da Comissão de 30 de maio de 2008: temperatura ambiente (23 ± 2 °C) e iluminação fluorescente uniforme contínua do tipo branca fria (4 lâmpadas de 36 W/865 Osram L, Alemanha, à distância de 0,45 m) ^[13]. De modo a manter as algas em suspensão, e consequentemente melhorar as trocas gasosas e reduzir a variação do pH, estas foram agitadas borbulhando ar filtrado através de uma bomba (Tetrattec, Alemanha). Iniciou-se uma nova cultura semanalmente, tendo posteriormente procedido à sua observação num microscópio ótico (Leica, modelo DM 500, Alemanha), de forma a assegurar que não contém contaminação por microrganismos.

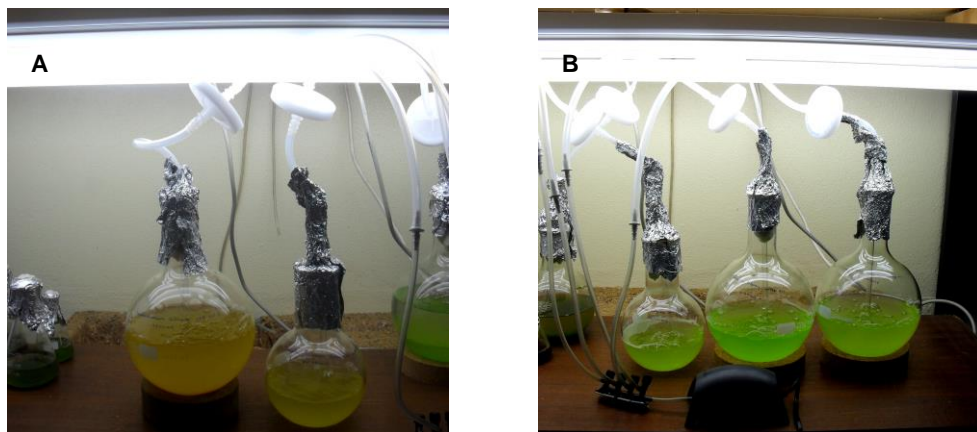


Figura 6.1 – Culturas de alga: A) *Pseudokirchneriella subcapitata*; B) *Chlorella vulgaris*.

6.3. Meio nutriente

O meio de cultura foi preparado a partir de quatro soluções *stock*, com a composição e as concentrações indicadas na Tabela 6.1, utilizando água desionizada na diluição.

As soluções *stock* nºs 1, 2 e 3, a água desionizada e todo o material utilizado na preparação foram autoclavados, tendo-se optado por filtrar a solução nº 4 num filtro de membrana estéril de celulose com 0,45 µm de diâmetro de poro (GN-6 metricel®, PALL Gelman, Michigan, EUA) na câmara de fluxo laminar, devido à possível precipitação do hidrogênio-carbonato de sódio. O meio de cultura foi também preparado na câmara de fluxo laminar, diluindo em cerca de 900 mL de água desionizada previamente autoclavada, 9 mL de solução nº 1 e 0,9 mL de cada uma das restantes soluções *stock*. O meio de cultura preparado apresentou um pH de cerca de 7,9, tendo sido conservado a 4 °C até à sua utilização.

Tabela 6.1 – Composição e respetiva concentração nas soluções de reserva ^[13].

Composição das soluções de reserva	Concentração na solução de reserva
nº 1: macronutrientes	
NH ₄ Cl	1,5 g/L
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,2 g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,8 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5 g/L
KH ₂ PO ₄	0,16 g/L
nº 2	
FeCl ₃ .6H ₂ O	80 mg/L
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	100 mg/L
nº 3: micronutrientes	
H ₃ BO ₃	185 mg/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	415 mg/L
ZnCl ₂	3 mg/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	1,5 mg/L
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,01 mg/L
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	7 mg/L
nº 4	
NaHCO ₃	50 g/L

6.4. Substância de referência

De forma a demonstrar a adequabilidade das condições utilizadas nos ensaios laboratoriais, realizou-se inicialmente um ensaio com a substância inibidora de referência dicromato de potássio. A escolha deste composto teve que ver com o facto de ser muito utilizado como referência para algas verdes, apesar de a sua cor poder afetar a qualidade e intensidade da luz que as algas recebem, podendo também influenciar as determinações espectrofotométricas. Foi preparada uma solução com concentração aproximada de 10 mg/L utilizando meio de cultura para a diluição, tendo posteriormente sido autoclavada.

6.5. Substâncias de ensaio

Os compostos farmacêuticos avaliados neste trabalho foram o ibuprofeno e os seus metabolitos, carboxi-ibuprofeno e 2-hidroxi-ibuprofeno. A Comissão Europeia incluiu em junho de 2010 o ibuprofeno na lista das possíveis 19 novas substâncias prioritárias, no âmbito da Diretiva-Quadro da Água (DQA). No entanto, foi excluído em janeiro de 2012 devido aos riscos para o meio aquático demonstrados até então não terem sido considerados suficientes ^[91,101,107]. Com este trabalho pretende-se fortalecer a avaliação da toxicidade do ibuprofeno e estimar a toxicidade dos seus metabolitos, devido a haver uma reduzida informação na literatura.

Foram preparadas soluções *stock* com concentrações aproximadas de 40 e 20 mg/L para o ibuprofeno e os metabolitos respetivamente, utilizando meio de cultura na diluição.

6.6. Procedimento experimental

Os ensaios de ecotoxicidade consistiram em expor culturas de algas *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*, em fase de crescimento exponencial e sob condições definidas, a diferentes concentrações das substâncias de referência (dicromato de potássio) e de ensaio (ibuprofeno e seus metabolitos), durante diversas gerações.

De modo a garantir um crescimento exponencial ao longo do período de incubação sem suceder um esgotamento de nutrientes, foi necessário assegurar que a biomassa de algas inicial era suficientemente baixa. Assim, foi necessário realizar previamente um ajuste diluindo a alga com meio de cultura, de forma a obter um valor inicial de absorvância próximo de 0,1.

A preparação decorreu numa câmara de fluxo laminar, consistindo em adicionar a matrizes de 250 mL previamente autoclavados 10 mL de alga e diferentes volumes da substância em estudo, aferindo o volume de 100 mL com meio de cultura. Na Tabela 6.2 encontram-se resumidas as condições utilizadas, tendo os matrizes sido tapados com algodão cardado (Hidrofer) e gaze hidrófila (Luteme), e mantidos durante um período de 72 ± 2 horas nas mesmas condições a que as culturas de algas foram sujeitas: temperatura ambiente e iluminação fluorescente uniforme contínua do tipo branca fria. Relativamente à agitação, esta foi realizada manualmente duas vezes por dia, tendo a sua posição sido trocada aleatoriamente para que recebessem uma quantidade de luz uniforme.

Relativamente à concentração de substância avaliada nos ensaios, esta teve de ser adaptada à sensibilidade da alga. Assim, na avaliação do dicromato de potássio testou-se a gama de 0,25 a 4 mg/L para a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* e de 0,0625 a 1 mg/L para a alga *Chlorella vulgaris*. No estudo do ibuprofeno avaliou-se a gama de 4 a 36 mg/L para ambas as algas, enquanto nos metabolitos de 1 a 8 mg/L para a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* e de 0,5 a 8 mg/L para a alga *Chlorella vulgaris*. Os volumes utilizados nos ensaios referidos anteriormente encontram-se no anexo A, sub-seções A.2 a A.4.

Tabela 6.2 – Resumo das condições utilizadas no ensaio de ecotoxicidade.

Parâmetro	Condição
Tipo de teste	estático sem renovação
Temperatura	23 °C ± 2 °C
Qualidade de iluminação	luz fluorescente branca fria
Intensidade da luz	4 lâmpadas de 36 W (distância de 0,45 m)
Fotoperíodo	iluminação contínua
Recipiente de teste	matrizes de 250 mL
Volume de solução-teste	100 mL
Densidade celular inicial	10 ⁴ células/mL
Agitação	manual, duas vezes por dia
Concentrações testadas	5 e um controlo (4 e um controlo para os metabolitos avaliados com a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)
Nº de réplicas	3
Duração do teste	72 ± 2 horas
Parâmetro de avaliação	crescimento (avaliado através da densidade ótica)
Amostragem	início e fim do teste

6.7. Parâmetros de avaliação

O parâmetro avaliado neste estudo foi a inibição do crescimento algal, cuja estimativa foi realizada através da medida da absorvância inicial e final, e posteriormente correlacionada com a densidade celular. Adicionalmente avaliou-se o pH e a concentração de substância-teste no princípio e no final do ensaio, de forma a garantir a validade do teste.

6.7.1. Inibição do crescimento de algas

A concentração de algas inicial e final foi avaliada pela absorvância medida num espectrofotômetro UV/visível (Jenway, modelo 6405, EUA) (Figura 6.2) no comprimento de onda de 440 nm ^[156].



Figura 6.2 – Espectrofotômetro UV/visível (Jenway, modelo 6405) ^[157].

De forma a estabelecer uma correlação entre a absorvância e a densidade celular, prepararam-se soluções com diferentes concentrações de alga, a partir de uma absorvância inicial de cerca de 0,6 e usando água desionizada como meio de diluição. Os volumes utilizados nas várias preparações encontram-se no anexo A, sub-secção A.1, tendo para cada uma sido quantificada a densidade celular (nº células/mL), recorrendo a uma câmara de contagem (Blaubrand, modelo Neubauer improved, Alemanha) (Figura 6.3) com auxílio de um microscópio ótico (Leica, modelo DM 500, Alemanha), e medida a absorvância.



Figura 6.3 – Câmara de contagem (Blaubrand, modelo Neubauer improved) ^[158].

A avaliação destes dois parâmetros permitiu construir uma curva de calibração que os relaciona diretamente, possibilitando estimar a absorvância nos ensaios em vez da densidade celular, tarefa que tornaria o teste muito moroso. Assim, foi possível correlacionar a absorvância com a densidade celular, correspondendo o crescimento algal à diferença entre a densidade celular final e inicial. A inibição do crescimento foi calculada pela redução do crescimento de algas no ensaio com o composto, relativamente à cultura de controlo.

Adicionalmente construiu-se uma curva de calibração que relaciona a absorvância com a biomassa seca (mg/mL). Para isso, filtrou-se um determinado volume das soluções anteriores em filtros de membrana de celulose previamente lavados, secos em estufa (P selecta, Barcelona, Espanha) e pesados numa balança (Mettler Toledo, modelo MS205DU). Colocaram-se os filtros com alga a secar numa estufa a 50°C e procedeu-se à sua pesagem após atingir peso constante.

6.7.2. pH

O pH foi avaliado com um eléctrodo de vidro combinado, conectado a um decimilivoltímetro (Crison®, modelo pH meter GLP 22, Barcelona, Espanha) (Figura 6.4).



Figura 6.4 – Eléctrodo de vidro combinado conectado a um decimilivoltímetro (Crison®, modelo pH meter GLP 22) ^[159].

6.7.3. Concentração de substância de ensaio

A concentração de substância-teste (ibuprofeno e metabólitos) inserida nas culturas, bem como a remanescente no final do ensaio, foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de fluorescência (LC-FLD), utilizando um método cromatográfico adaptado de Bragança et al., 2012 [91]. As amostras foram previamente filtradas através de um filtro seringa de nylon com tamanho de poro de 0,22 µm (Specanalítica), colocadas em vials de cor âmbar para prevenir a degradação das substâncias com a luz solar, e armazenadas a -18 °C, até à análise. As amostras foram homogeneizadas num misturador vortex (Nahita 681/5, Navarra, Spain) antes da análise cromatográfica, tendo concentrações superiores a 4 mg/L sido diluídas para este valor, utilizando meio de cultura na diluição.

A análise cromatográfica foi realizada num sistema Prominence (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão) (Figura 6.5), equipado com bomba LC-20AD, unidade de degaseificação DGU-2A_{5R}, injetor automático SIL-20A_{HT}, detetor de fluorescência RF-20A_{XS}, forno da coluna CTO-10 AS_{VP}, controlador CBM-20A e programa LC Solution para o controlo e o processamento dos dados.



Figura 6.5 – Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de fluorescência (Prominence Shimadzu) [160].

A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Luna C18 (5 µm; 4,6x150 mm; Phenomenex, Torrance, USA) e a fase móvel consistia em água ultra-pura acidificada (pH 3, ajustado com ácido acético) como eluente A, e acetonitrilo (ACN) como eluente B. A corrida cromatográfica teve uma duração de 40 minutos, utilizando-se um programa em gradiente inicialmente com 70-30% água ultra-pura acidificada-ACN, variando gradualmente para 40-60% água ultra-pura acidificada-ACN durante 30 minutos, voltando às condições iniciais de 70-30% água ultra-pura acidificada-ACN em 2 minutos e

permanecendo nestas condições durante 8 minutos. O caudal utilizado foi de 1 mL/min e o volume de injeção foi de 20 µL, tendo a análise sido realizada com a coluna à temperatura de 25 °C. A detecção de fluorescência foi realizada com um par de comprimentos de onda de excitação/emissão de 220/290 nm, e a identificação dos compostos foi baseada no tempo de retenção, no par de comprimentos de onda de excitação/emissão e no método da curva de calibração externa. Na Tabela 6.3 encontram-se resumidas as condições analíticas utilizadas.

Tabela 6.3 – Resumo das condições cromatográficas utilizadas ^[adaptado de 91]

Coluna cromatográfica	coluna Luna C18 (5 µm; 4,6x150 mm; Phenomenex)
Eluente A	água ultra-pura acidificada (pH 3, ajustado com ácido acético)
Eluente B	acetonitrilo (ACN)
Gradiente	0-30 min: 70-30% a 40-60% água-ACN 30-32 min: 40-60% a 70-30% água-ACN 32-40 min: 70-30% água-ACN
Caudal	1 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Temperatura da coluna	25 °C
Comprimentos de onda de excitação/emissão	220/290 nm
Tempo da corrida	40 min

6.8. Análise de dados

Os valores de absorvância inicial e final obtidos a 440 nm foram transformados em densidade celular, através de uma curva de calibração. O crescimento algal foi calculado pela diferença entre a densidade celular final e inicial, correspondendo a inibição do crescimento à redução de algas no ensaio com substância, relativamente à cultura de controlo. Considerou-se como critério de aceitabilidade uma variabilidade inferior a 20% entre as réplicas.

Os resultados de ecotoxicidade obtidos foram analisados estatisticamente de acordo com o sugerido pela EPA [57]. Assim, começou-se por avaliar a normalidade da distribuição dos resultados obtidos para cada concentração pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variância pelo teste de Bartlett.

Teste de Shapiro-Wilk

$$D = \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2$$

em que:

X_i – observação centrada i

\bar{X} – média de todas as observações centradas

n – número total de observações centradas

$$W = \frac{1}{D} \left[\sum_{i=1}^k a_i (X^{(n-i+1)} - X^{(i)}) \right]^2$$

onde:

a_i – coeficientes para o teste de Shapiro-Wilk

k – correspondente a $n/2$ se n for par e $(n-1)/2$ se n for ímpar

Se o valor de W obtido for superior ao valor crítico tabelado para o teste, considerando um nível de significância de 0,01 e n observações centradas, os dados têm uma distribuição normal.

Teste de Bartlett

$$\bar{s}^2 = \frac{(\sum_{i=1}^p V_i S_i^2)}{\sum_{i=1}^p V_i}$$

em que:

V_i – graus de liberdade para cada concentração testada e controlo, $V_i = n-1$

$i = 1, 2, \dots, p$, em que p é o número de concentrações testadas incluindo o controlo

$$C = 1 + (3(p-1))^{-1} \left[\sum_{i=1}^p \frac{1}{V_i} - \left(\sum_{i=1}^p V_i \right)^{-1} \right]$$

$$B = \frac{[(\sum_{i=1}^p V_i) \ln \bar{s}^2 - \sum_{i=1}^p V_i \ln S_i^2]}{C}$$

Se o B obtido tiver valor inferior ao valor crítico para essa distribuição, para um nível de significância de 0,01 e $p-1$ graus de liberdade, há homogeneidade de variância.

Após verificar os requisitos de distribuição normal e homogeneidade de variância dos dados obtidos para cada concentração, utiliza-se o teste de Dunnett para estimar os valores de CENO e CEO.

Teste de Dunnett

$$t_i = \frac{(\bar{Y}_i - \bar{Y}_1)}{S_w \sqrt{\left(\frac{1}{n_1}\right) + \left(\frac{1}{n_i}\right)}}$$

onde:

\bar{Y}_i – contagem média de células para a concentração i

\bar{Y}_1 – contagem média de células para o controlo

S_w – raiz quadrada do quadrado médio dentro

n_1 – número de réplicas para o controlo

n_i – número de réplicas para a concentração i

Se o valor de t_i obtido for superior ao valor crítico para essa distribuição, com um nível de significância de 0,05, N-p graus de liberdade e concentrações excluindo o controle, as concentrações testadas têm significativamente menor número de células do que o controle, e CENO e CEO são as duas concentrações cujos t_i 's se encontram abaixo do valor crítico, sendo o valor de CENO inferior ao de CEO.

Utiliza-se ainda o método de interpolação linear para avaliar os valores da CE_{50} e da CE_{25} .

Método de interpolação linear

$$CE_x = C_j + [M_1(1 - p/100) - M_j] \left[\frac{C_{j+1} - C_j}{M_{j+1} - M_j} \right]$$

sendo:

CE_x – concentração efetiva que causa x % de inibição

C_j – concentração de ensaio testada cujo efeito de inibição é imediatamente inferior à inibição x pretendida

M_1 – média da resposta de inibição para o controle

C_{j+1} – concentração de ensaio testada cujo efeito de inibição é imediatamente superior à inibição x pretendida

M_j – média da resposta de inibição para a concentração do ensaio C_j

M_{j+1} – média da resposta de inibição para a concentração do ensaio C_{j+1}

Os valores de CENO e CEO são determinados por análise de variância e testes de comparação múltipla. Assim, é utilizada a variância de dados para determinar os ensaios que são significativamente diferentes do controle, dependendo da variabilidade dos dados, do nível de significância escolhido e do tamanho da amostra. Por estes motivos, alguns autores defendem o cálculo de valores de CE de baixo efeito, como por exemplo CE_{10} , em alternativa ao cálculo de CENO^[161].

Devido a ter sido utilizada uma técnica de interpolação linear para calcular uma estimativa dos valores de CE, não podem ser aplicados métodos estatísticos padrão para o cálculo dos intervalos de confiança^[14].

7. Resultados e discussão

Os ensaios de ecotoxicidade do ibuprofeno e dos seus metabolitos, carboxi-ibuprofeno e 2-hidroxi-ibuprofeno, utilizando as microalgas *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*, encontram-se documentados em fotografias em anexo, na secção B, e os resultados experimentais obtidos relativamente à absorvância, pH e concentração apresentam-se na secção C.

De forma a garantir os critérios de qualidade do teste foi necessário verificar alguns pressupostos. Calculou-se o fator de aumento da densidade celular no fim do teste nas culturas de controlo, tendo-se verificado que foi superior a 16. Mediu-se o pH inicial e final, tendo-se confirmado que a amplitude da variação deste parâmetro nas culturas de controlo foi inferior a 1,5 unidades.

Avaliou-se também a concentração das substâncias de ensaio por LC-FLD, utilizando as condições cromatográficas descritas na sub-secção 6.7.3, que permitiram confirmar que no final do teste a concentração se mantém a mais de 80% do valor inicial. Para as condições cromatográficas utilizadas obtiveram-se os seguintes tempos de retenção: 6,8 minutos para o 2-hidroxi-ibuprofeno, 7,8 minutos para o carboxi-ibuprofeno e 27,8 minutos para o ibuprofeno (Figura C.1), tendo a concentração sido calculada pela área dos picos através de uma curva de calibração externa. A validação da metodologia analítica desenvolvida compreendeu a determinação da linearidade, do limite de deteção (LD) e do limite de quantificação (LQ). As curvas de calibração obtidas pela regressão linear deram bons ajustes (coeficientes de correlação $\geq 0,9999$), encontrando-se na Tabela 7.1 os coeficientes de correlação e os limites calculados.

Tabela 7.1 – Coeficientes de correlação e limites de deteção (LD) e de quantificação (LQ) obtidos para as diferentes substâncias.

	Coeficientes de correlação	LD (mg/L)	LQ (mg/L)
Ibuprofeno	0,9999	0,034	0,113
Carboxi-ibuprofeno	0,9999	0,006	0,022
2-Hidroxi-ibuprofeno	0,9999	0,008	0,027

7.1. Curvas de calibração

Os valores de absorvância a 440 nm foram correlacionados com a densidade celular e com a concentração de alga, obtendo-se as curvas de calibração que se apresentam de seguida nas Figuras 7.1 a 7.4.

7.1.1. Curvas de calibração absorvância versus densidade celular

Nas Figuras 7.1 e 7.2 representam-se as curvas de calibração absorvância versus densidade celular obtidas para as algas *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*, respetivamente.

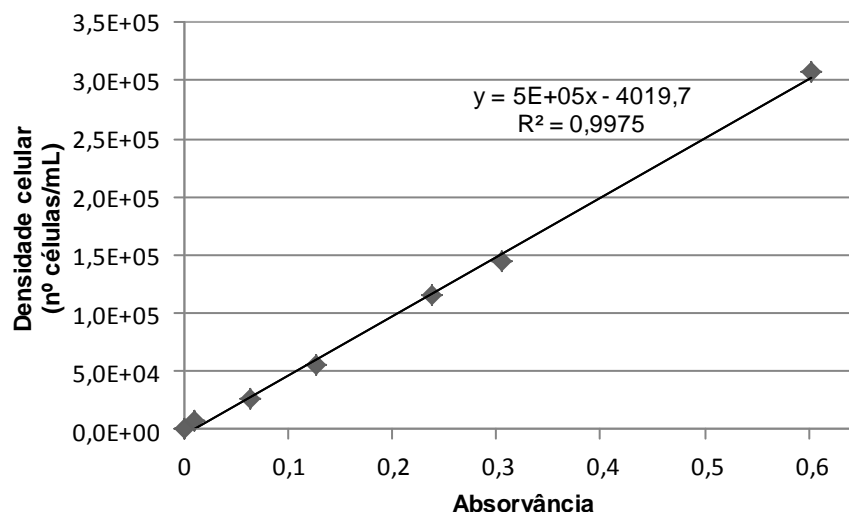


Figura 7.1 – Curva de calibração absorvância versus densidade celular para a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

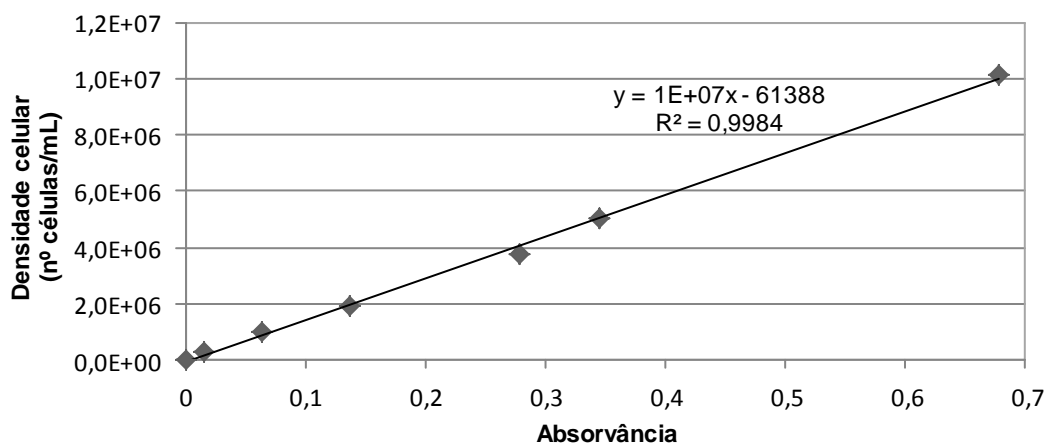


Figura 7.2 – Curva de calibração absorvância versus densidade celular para a alga *Chlorella vulgaris*.

A observação das curvas permite verificar que existe uma elevada concordância entre os resultados obtidos pelos dois métodos (coeficientes de correlação $\geq 0,9975$), permitindo para absorvâncias entre 0,01 e 0,60 para a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, e 0,02 e 0,68 para a espécie *Chlorella vulgaris*, prever a densidade celular de forma bastante eficiente.

7.1.2. Curvas de calibração absorvância versus concentração de alga

Nas Figuras 7.3 e 7.4 apresentam-se as curvas de calibração absorvância versus concentração para as algas *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*, respetivamente.

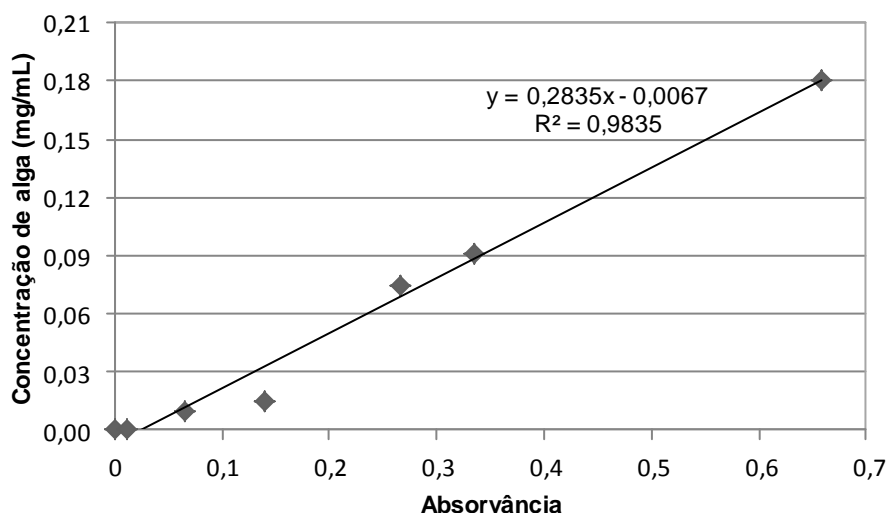


Figura 7.3 – Curva de calibração absorvância versus concentração de alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

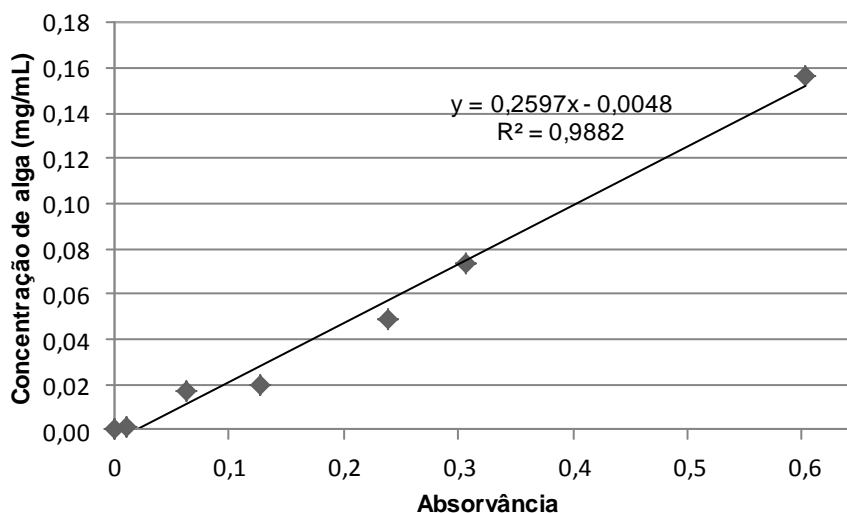


Figura 7.4 – Curva de calibração absorvância versus concentração de alga *Chlorella vulgaris*.

As curvas absorvância *versus* concentração de alga apresentam uma menor correlação relativamente às anteriores (coeficientes de correlação $\geq 0,9835$), podendo estar relacionado com o facto de terem sido realizadas várias etapas (filtração e secagem), potenciando assim a introdução de erros no procedimento analítico, e com o facto de neste método gravimétrico estarem envolvidas pesagens de massa de baixo valor.

7.2. Testes de inibição

Foram realizados testes de inibição com a substância inibidora de referência dicromato de potássio, e com as substâncias-teste ibuprofeno, carboxi-ibuprofeno e 2-hidroxi-ibuprofeno.

As absorvâncias inicial e final medidas a 440 nm foram transformadas em densidade celular através da curva de calibração, tendo sido calculado o crescimento algal pela diferença entre a densidade celular final e inicial, e estimada a inibição do crescimento pela redução de algas no ensaio com substância relativamente à cultura de controlo.

De seguida apresentam-se os resultados das taxas médias de inibição em função das concentrações de substância testada, com os respetivos valores máximos e mínimos verificados.

7.2.1. Inibição do crescimento algal para o dicromato de potássio

Nas Figuras 7.5 e 7.6 encontra-se a inibição do crescimento algal em função da concentração de dicromato de potássio, obtida para as algas *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*, respetivamente.

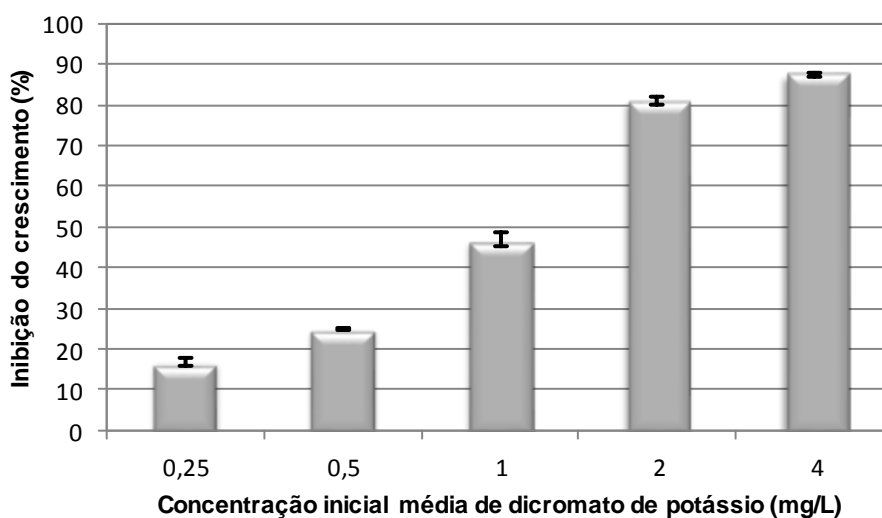


Figura 7.5 – Inibição do crescimento da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* em função da concentração de dicromato de potássio.

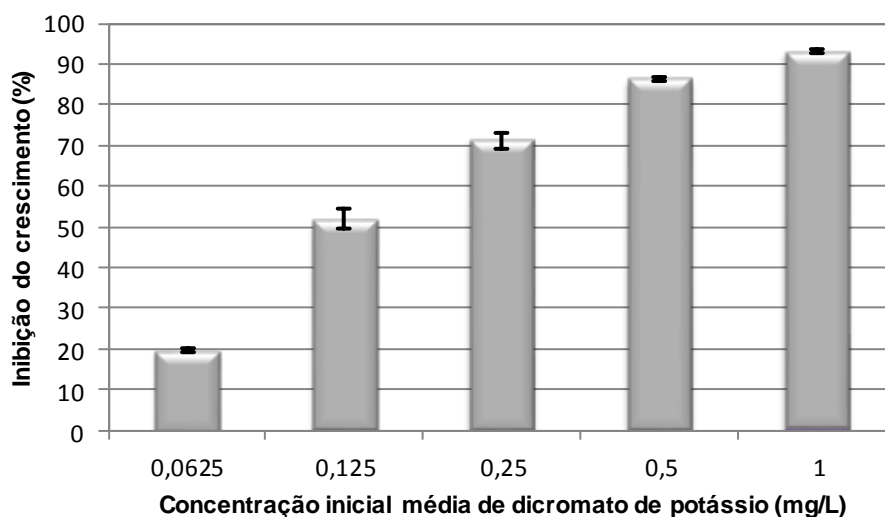


Figura 7.6 – Inibição do crescimento da alga *Chlorella vulgaris* em função da concentração de dicromato de potássio.

Comparando as figuras 7.5 e 7.6, verifica-se que para alcançar inibições de crescimento semelhantes é necessário maior concentração de dicromato de potássio para a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, o que indica que a alga *Chlorella vulgaris* possui maior sensibilidade a esta substância.

7.2.2. Inibição do crescimento algal para o ibuprofeno

Nas Figuras 7.7 e 7.8 apresenta-se a inibição do crescimento algal em função da concentração de ibuprofeno, obtida para as algas *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*, respectivamente.

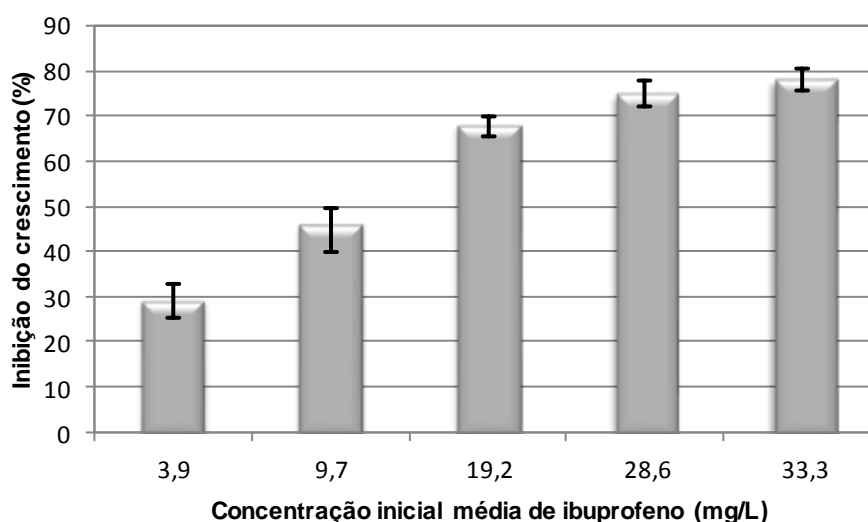


Figura 7.7 – Inibição do crescimento da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* em função da concentração de ibuprofeno.

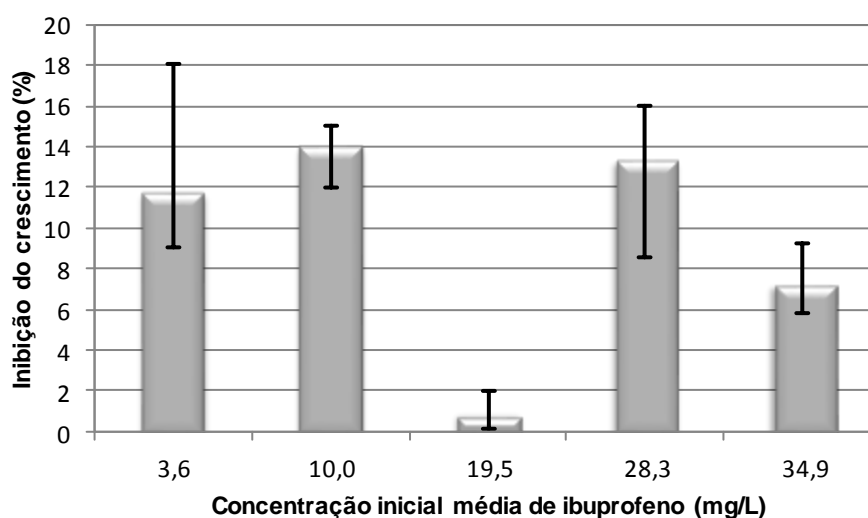


Figura 7.8 – Inibição do crescimento da alga *Chlorella vulgaris* em função da concentração de ibuprofeno.

As figuras mostram que o ibuprofeno provocou inibições mais baixas na alga *Chlorella vulgaris*, indicando que a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* possui maior sensibilidade a esta substância, contrariamente ao verificado com o dicromato de potássio.

7.2.3. Inibição do crescimento algal para o carboxi-ibuprofeno

Nas Figuras 7.9 e 7.10 representa-se a inibição do crescimento algal em função da concentração de carboxi-ibuprofeno, obtida para as algas *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*, respetivamente.

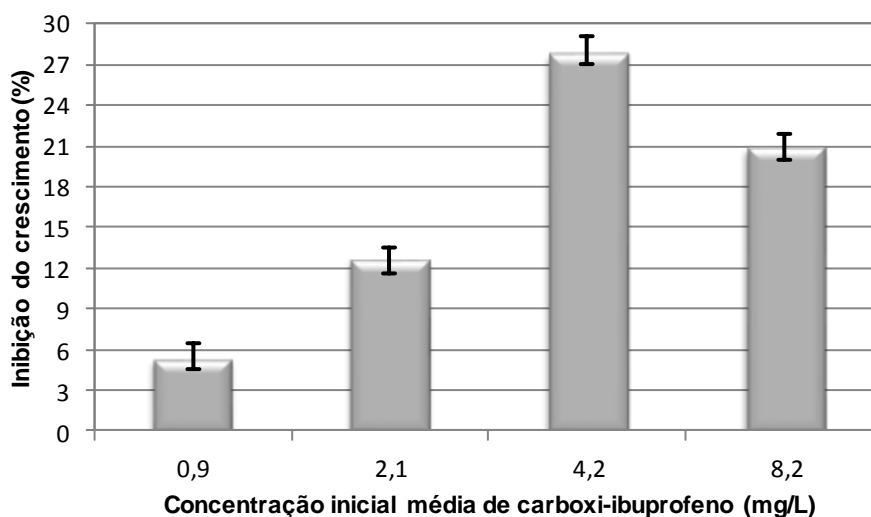


Figura 7.9 – Inibição do crescimento da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* em função da concentração de carboxi-ibuprofeno.

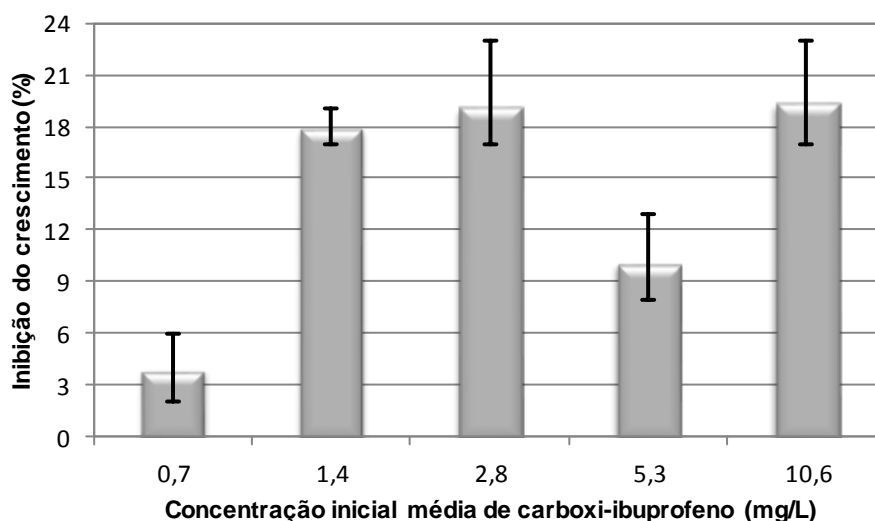


Figura 7.10 – Inibição do crescimento da alga *Chlorella vulgaris* em função da concentração de carboxi-ibuprofeno.

A análise das figuras indica que para as concentrações testadas, o carboxi-ibuprofeno causou baixas inibições de crescimento nas algas *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*.

7.2.4. Inibição do crescimento algal para o 2-hidroxi-ibuprofeno

Nas Figuras 7.11 e 7.12 encontra-se a inibição do crescimento algal em função da concentração de 2-hidroxi-ibuprofeno, obtida para as algas *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*, respectivamente.

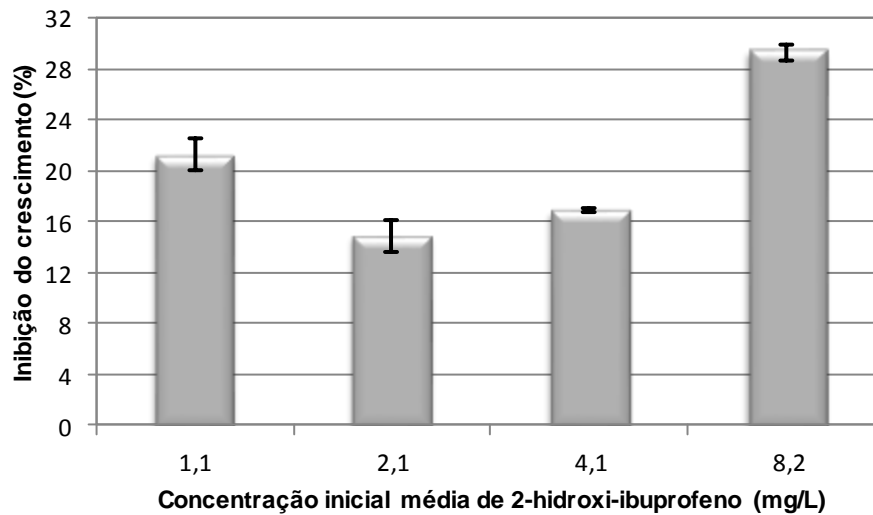


Figura 7.11 – Inibição do crescimento da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* em função da concentração de 2-hidroxi-ibuprofeno.

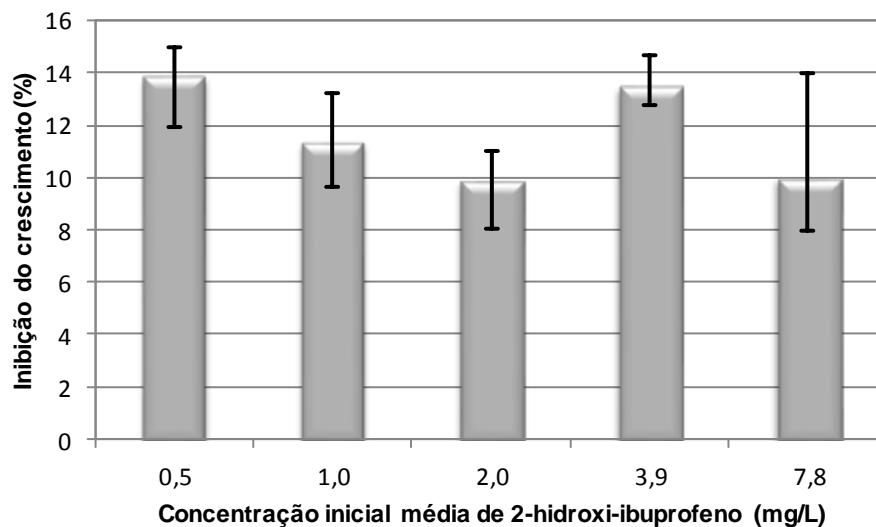


Figura 7.12 – Inibição do crescimento da alga *Chlorella vulgaris* em função da concentração de 2-hidroxi-ibuprofeno.

A observação das figuras permite verificar que para as concentrações testadas, o 2-hidroxi-ibuprofeno deu origem a baixas inibições de crescimento nas algas *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*.

7.3. Análise de dados dos testes de ecotoxicidade

Os resultados de ecotoxicidade obtidos foram analisados estatisticamente de acordo com o procedimento sugerido pela EPA, encontrando-se em anexo, na secção D, um exemplo da análise de dados realizada para o teste de dicromato de potássio com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, e na secção E todos os parâmetros obtidos [57].

Na Tabela 7.2 encontram-se os valores de CE_{50} , CE_{25} , CE_{10} , CEO e CENO, obtidos para os ensaios de ecotoxicidade realizados.

Tabela 7.2 – Resultados obtidos na análise dos dados de ecotoxicidade.

Ensaio		CE_{50} (mg/L)	CE_{25} (mg/L)	CE_{10} (mg/L)	CEO	CENO
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	dicromato de potássio	1,10	0,50	ND ^a	ND ^a	ND ^a
	ibuprofeno	11,39*	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
	carboxi-ibuprofeno	ND ^b	3,78*	1,70*	ND ^b	ND ^b
	2-hidroxi-ibuprofeno	ND ^b	6,72*	ND ^b	ND ^b	ND ^b
<i>Chlorella vulgaris</i>	dicromato de potássio	0,12	0,07	ND ^a	ND ^a	ND ^a
	ibuprofeno	ND ^b	ND ^b	12,88	3,60	ND ^b
	carboxi-ibuprofeno	ND ^b	ND ^b	1,03	0,70	ND ^b
	2-hidroxi-ibuprofeno	ND ^b	ND ^b	1,94	ND ^b	ND ^b

ND: não determinado devido a: ^a altas taxas de inibição observadas; ^b baixas taxas de inibição observadas.
* valor estimado apesar de não obedecer ao critério de distribuição normal.

7.3.1. Toxicidade do dicromato de potássio

Os resultados de ecotoxicidade obtidos para o dicromato de potássio apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância, no entanto, devido a terem sido alcançadas elevadas inibições de crescimento não foi possível determinar os parâmetros CE_{10} , CEO e CENO. Calculou-se apenas a CE_{50} e a CE_{25} , tendo obtido os valores de 1,10 e 0,50 mg/L para a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, e de 0,12 e 0,07 mg/L para a alga *Chlorella vulgaris*. Assim, 1,10 e 0,12 mg/L são as concentrações que causam um parâmetro sub-letal a 50% dos organismos nas algas *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*, respetivamente, e 0,50 e 0,07 mg/L são as concentrações que causam um parâmetro sub-letal a 25% dos organismos nas algas *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*.

A CE_{50} obtida para a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* está de acordo com o esperado, pois é da mesma ordem de grandeza do intervalo de valores estabelecido no

Regulamento (CE) n.º 440/2008 da Comissão de 30 de maio de 2008 (0,60 a 1,03 mg/L)^[13]. Desta forma, os resultados obtidos com a substância inibidora de referência demonstraram que as condições utilizadas nos ensaios foram adequadas.

Os valores obtidos indicaram que a alga *Chlorella vulgaris* possui uma maior sensibilidade ao dicromato de potássio, permitindo os resultados inferir que os níveis de toxicidade de uma espécie não podem ser extrapolados para outras, pois não existem espécies que são sempre as mais ou as menos sensíveis^[162].

7.3.2. Toxicidade do ibuprofeno

Os resultados do ensaio de ecotoxicidade do ibuprofeno com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* não apresentaram distribuição normal, no entanto, como correspondia apenas a um ligeiro desvio entre o W calculado e o valor crítico, optou-se por estimar os resultados. Obtiveram-se elevadas inibições de crescimento possibilitando apenas determinar a CE₅₀, para a qual se obteve o valor estimado de 11,39 mg/L.

Para a espécie *Chlorella vulgaris* obteve-se uma distribuição normal e homogeneidade de variância, contudo, devido às inibições de crescimento terem sido baixas para concentrações inferiores a 34,9 mg/L, calculou-se apenas a CE₁₀ e a CEO, para as quais se obtiveram os valores de 12,88 e 3,60 mg/L, respetivamente. Desta forma, 12,88 mg/L corresponde à concentração que causa um parâmetro sub-letal a 10% dos organismos, e 3,60 mg/L à menor concentração de agente tóxico capaz de provocar efeitos adversos.

O valor da CE₅₀ obtido para a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* está incluído no intervalo 10 a 100 mg/L, que de acordo com a Diretiva 93/67/CEE, de 20 de julho, classifica o ibuprofeno como nocivo para os organismos aquáticos^[113]. Existem informações muito discordantes na literatura, pois Harada et al, 2008, realizaram um ensaio de 96h com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* tendo obtido um valor de CE₅₀ de 2,30 mg/L, enquanto Cleuvers et al, 2004, no teste com a alga *Scenedesmus subspicatus*, obtiveram o valor de 342,20 mg/L^[93,151].

Os resultados indicaram que o ibuprofeno é mais tóxico para a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* do que para a espécie *Chlorella vulgaris*, contrariamente ao obtido no ensaio de dicromato de potássio, permitindo concluir mais uma vez que os níveis de toxicidade de uma espécie não podem ser extrapolados para outras^[162].

7.3.3. Toxicidade do carboxi-ibuprofeno

Os valores obtidos no ensaio de ecotoxicidade do carboxi-ibuprofeno com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* não apresentaram distribuição normal, contudo, devido a ter-se obtido um ligeiro desvio entre o W calculado e o valor crítico, optou-se por estimar os resultados. Esta alga não apresentou inibições significativas para concentrações inferiores a 8,2 mg/L, tendo apenas sido possível calcular a CE_{25} e a CE_{10} , para as quais se obteve os valores estimados de 3,78 e 1,70 mg/L, respetivamente.

Para a espécie *Chlorella vulgaris* obteve-se distribuição normal e homogeneidade de variância, e devido a se terem obtido baixas inibições para concentrações inferiores a 10,6 mg/L, calculou-se apenas a CE_{10} e a CEO , cujos valores obtidos foram 1,03 e 0,70 mg/L, respetivamente.

7.3.4. Toxicidade do 2-hidroxi-ibuprofeno

Os resultados obtidos no ensaio de ecotoxicidade do 2-hidroxi-ibuprofeno com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* não apresentaram distribuição normal, porém, o W calculado e o valor crítico apresentaram ligeiros desvios, pelo que se opou por estimar os resultados. Esta alga apresentou baixas inibições para concentrações inferiores a 8,2 mg/L, tendo apenas sido possível calcular a CE_{25} , para a qual se obteve o valor estimado de 6,72 mg/L.

Para a espécie *Chlorella vulgaris* obteve-se distribuição normal e homogeneidade de variância, e devido a terem sido obtidas baixas inibições para concentrações inferiores a 7,8 mg/L, calculou-se apenas a CE_{10} , cujo valor foi de 1,94 mg/L.

8. Conclusão e sugestões para trabalho futuro

Este trabalho teve como principal objetivo avaliar a ecotoxicidade do ibuprofeno e dos seus metabolitos, carboxi-ibuprofeno e 2-hidroxi-ibuprofeno, utilizando as microalgas *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*.

No ensaio de ecotoxicidade do ibuprofeno com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* obteve-se uma CE_{50} estimada de 11,39 mg/L, que o classifica como nocivo para os organismos aquáticos, segundo a Diretiva 93/67/CEE, de 20 de julho. A alga *Chlorella vulgaris* apresentou um comportamento muito diferente, alcançando uma CE_{10} de 12,88 mg/L e uma CEO de 3,60 mg/L. Face a estes resultados, é possível concluir, que o ibuprofeno apresenta maior toxicidade para a espécie *Pseudokirchneriella subcapitata* do que para a *Chlorella vulgaris*, permitindo inferir que os níveis de toxicidade de uma espécie não podem ser extrapolados para outras.

Para o carboxi-ibuprofeno obteve-se uma CE_{25} estimada de 3,78 mg/L e uma CE_{10} estimada de 1,70 mg/L com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, e uma CE_{10} de 1,03 mg/L e uma CEO de 0,70 mg/L para a alga *Chlorella vulgaris*. Relativamente ao metabolito 2-hidroxi-ibuprofeno, obteve-se uma CE_{25} estimada de 6,72 mg/L para a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, e uma CE_{10} de 1,94 mg/L para a espécie *Chlorella vulgaris*. As concentrações testadas para os metabolitos não foram prejudiciais para o crescimento das algas avaliadas, no entanto, concentrações mais elevadas poderão ter efeitos nocivos.

A utilização de testes de ecotoxicidade utilizando as algas *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris* demonstrou ser uma estratégia económica, fácil de implementar e eficiente. Assim, os ensaios de ecotoxicidade com microalgas representaram uma abordagem eficaz do ponto de vista de proteção do meio aquático, permitindo prever o impacto ambiental de águas residuais contaminadas, estabelecer os níveis de toxicidade permitidos em descargas ambientais e avaliar a eficiência das técnicas de tratamento utilizadas em estações de tratamento.

Relativamente ao trabalho futuro sugere-se:

- i) estudar concentrações superiores para o ibuprofeno com a alga *Chlorella vulgaris*, e para os metabolitos com ambas as algas;
- ii) realizar estudos de ecotoxicidade com outras espécies de alga e com organismos de outros níveis tróficos;
- iii) estender a aplicação deste estudo a outros fármacos de elevado consumo e seus metabolitos;
- iv) efetuar testes com misturas de fármacos, de forma a avaliar os efeitos sinérgicos ou aditivos, pois os medicamentos ocorrem no meio aquático na forma de misturas.

Referências bibliográficas

- [1] Lérová T, Hauschild MZ. Assessing the impacts of industrial water use in life cycle assessment. *CIRP Annals - Manufacturing Technology* 2011; 60: 29 - 32.
- [2] Plappally AK, Lienhard V JH. Energy requirements for water production, treatment, end use, reclamation, and disposal. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2012; 16: 4818 - 4848.
- [3] Gaspar R, Pereira L, Neto JM. Ecological reference conditions and quality states of marine macroalgae sensu Water Framework Directive: An example from the intertidal rocky shores of the Portuguese coastal waters. *Ecological Indicators* 2012; 19: 24 - 38.
- [4] Tölgyessy J. *Chemistry and Biology of Water, Air and Soil: Environmental Aspects*. Elsevier; 1993. p.10.
- [5] Tang JYM, Aryal R, Deletic A, Gernjak W, Glenn E, McCarthy D, et al. Toxicity characterization of urban stormwater with bioanalytical tools. *Water Research* 2013; 47: 5549 - 5606.
- [6] Oliveira JM, Santos JM, Teixeira A, Ferreira MT, Pinheiro PJ, Geraldés A, et al. Projeto AQUARIPORT: Programa Nacional de Monitorização de Recursos Piscícolas e de Avaliação da Qualidade Ecológica de Rios. Direcção-Geral dos Recursos Florestais. Lisboa; 2007.
- [7] Qu RJ, Wang XH, Feng MB, Li Y, Liu HX, Wang LS, et al. The toxicity of cadmium to three aquatic organisms (*Photobacterium phosphoreum*, *Daphnia magna* and *Carassius auratus*) under different pH levels. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2013; 95: 83 - 90.
- [8] Costa CR, Olivi P, Botta CMR, Espindola ELG. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. *Química Nova* 2008; 31 (7): 1820 - 1830.
- [9] Martins J, Teles LO, Vasconcelos V. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert system in aquatic toxicology: a review. *Environment International* 2007; 33: 414 - 425.

[10] Silva CSLM. Utilização de Ensaios Ecotoxicológicos na Avaliação de Risco Ambiental Promovido por Pesticidas: caso-estudo Brejo do Cagarrão. Dissertação de Mestrado em Engenharia do Ambiente: Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja; 2012.

[11] Magalhães DP, Filho ASF. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis* 2008; 12 (3): 355 - 381.

[12] Wu Y, Lin C, Yuan L. Characteristics of six cladocerans in relation to ecotoxicity testing. *Ecological Indicators* 2007; 7: 768 - 775.

[13] Regulamento (CE) n.º 440/2008 da Comissão de 30 de Maio de 2008, que estabelece métodos de ensaio nos termos do Regulamento (CE) n.º 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo ao registo, avaliação, autorização e registo de substâncias químicas (REACH). *Jornal Oficial da União Europeia*.

[14] Silva A, Santos LHMLM, Delerue-Matos C, Figueiredo SA. Impact of excipients in the chronic toxicity of fluoxetine on the alga *Chlorella vulgaris*. *Environmental Technology* 2014; 35 (24): 3124 - 3129.

[15] Entidade Reguladora dos Serviços de Água e Resíduos. Disponível em www.ersar.pt [acedido em 06/11/2013].

[16] Ministério do Ambiente. Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto. *Diário da República*. 1ª Série, nº 176, 3676 - 3722.

[17] Presidência do Conselho de Ministros. Declaração de Retificação n.º 22-C/98 de 30 de Novembro. *Diário da República*. 1ª Série, nº 277, 6638 - 6639.

[18] Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de Agosto. *Diário da República*. 1ª Série, nº 164, 5747 - 5765.

[19] Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território. Decreto-Lei n.º 243/2001 de 5 de Setembro. *Diário da República*. 1ª Série, nº 206, 5754 - 5765.

[20] Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Decreto-Lei n.º 135/2009 de 3 de Junho. Diário da República. 1ª Série, nº 107, 3460 - 3468.

[21] Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território. Decreto-Lei n.º 113/2012 de 23 de maio. Diário da República. 1ª Série, nº 100, 2715 - 2726.

[22] Ministério do Ambiente. Decreto-Lei n.º 152/97 de 19 de Junho. Diário da República. 1ª Série, nº 139, 2959 - 2966.

[23] Ministério do Ambiente. Decreto-Lei n.º 348/98 de 9 de Novembro. Diário da República. 1ª Série, nº 259, 5982 - 5983.

[24] Ministério das Cidades, Ordenamento do Território e Ambiente. Decreto-Lei n.º 149/2004 de 22 de Junho. Diário da República. 1ª Série, nº 145, 3805 - 3809.

[25] Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do desenvolvimento regional. Decreto-Lei n.º 198/2008 de 8 de Outubro. Diário da República. 1ª Série, nº 195, 7130 - 7133.

[26] Viana IG, Aboal JR, Fernández JA, Real C, Villares R, Carballeira A. Use of macroalgae stored in an Environmental Specimen Bank for application of some European Framework Directives. Water Research 2010; 44: 1713 - 1724.

[27] Questões significativas da Gestão da água - Região Hidrográfica do Vouga, Mondego, Lis e Ribeiras do Oeste. Participação pública. Instituto da Água (INAG), Administração da Região Hidrográfica do Centro (ARH Centro); 2009.

[28] Directiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Outubro de 2000, que estabelece um quadro de acção comunitária no domínio da política da água. Jornal Oficial das Comunidades Europeias.

[29] Assembleia da República. Lei nº 58/2005 de 29 de Dezembro. Diário da República. 1ª Série, nº 249, 7280 - 7310.

[30] Assembleia da República. Declaração de Retificação n.º 11-A/2006 de 23 de Fevereiro. Diário da República. 1ª Série, nº 39, 1524 - (2).

[31] Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Decreto-Lei n.º 245/2009 de 22 de Setembro. Diário da República. 1ª Série, nº 184, 6747 - 6748.

[32] Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território. Decreto-Lei n.º 130/2012 de 22 de junho. Diário da República. 1ª Série, nº 120, 3109 - 3139.

[33] Ministério da Economia e do Emprego. Decreto-Lei n.º 60/2012 de 14 de março. Diário da República. 1ª Série, nº 53, 1153 - 1172.

[34] Ministério da Agricultura, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Decreto-Lei n.º 77/2006 de 30 de Março. Diário da República. 1ª Série, nº 64, 2331 - 2354.

[35] Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território. Decreto-Lei n.º 103/2010 de 24 de Setembro. Diário da República. 1ª Série, nº 187, 4289 - 4296.

[36] Decisão n.º 2455/2011/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Novembro de 2001, que estabelece a lista das substâncias prioritárias no domínio da política da água e altera a Directiva 2000/60/CE. Jornal Oficial das Comunidades Europeias.

[37] Directiva 2006/11/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 15 de Fevereiro de 2006, relativa à poluição causada por determinadas substâncias perigosas lançadas no meio aquático da Comunidade. Jornal Oficial da União Europeia.

[38] Directiva 2008/32/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 11 de Março de 2008, que altera a Directiva 2000/60/CE que estabelece um quadro de acção comunitária no domínio da política da água, no que diz respeito às competências de execução atribuídas à Comissão. Jornal Oficial da União Europeia.

[39] Directiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro de 2008, relativa a normas de qualidade ambiental no domínio da política da água, que

altera e subsequentemente revoga as Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE e 86/280/CEE do Conselho, e que altera a Directiva 2000/60/CE. Jornal Oficial da União Europeia.

[40] Directiva 2009/31/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Abril de 2009, relativa ao armazenamento geológico de dióxido de carbono e que altera a Directiva 85/337/CEE do Conselho, as Directivas 2000/60/CE, 2001/80/CE, 2004/35/CE, 2006/12/CE e 2008/1/CE e o Regulamento (CE) n.º 1013/2006 do Parlamento Europeu do Conselho. Jornal Oficial da União Europeia.

[41] Directiva 2013/39/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 12 de agosto de 2013, que altera as Directivas 2000/60/CE e 2008/105/CE no que respeita às substâncias prioritárias no domínio da política da água. Jornal Oficial da União Europeia.

[42] Sánchez-Montoya MM, Arce MI, Vidal-Abarca MR, Suárez ML, Prat N, Gómez R. Establishing physico-chemical reference conditions in Mediterranean streams according to the European Water Framework Directive. *Water Research* 2012; 46: 2257 - 2269.

[43] Allan IJ, Vrana B, Greenwood R, Mills GA, Roig B, Gonzalez C. A “toolbox” for biological and chemical monitoring requirements for the European Union’s Water Framework Directive. *Talanta* 2006; 69: 302 - 322.

[44] Stefano LD. Facing the water framework directive challenges: A baseline of stakeholder participation in the European Union: a review. *Journal of Environmental Management* 2010; 91: 1332 - 1340.

[45] Valinia S, Hansen HP, Futter MN, Bishop K, Sriskandarajah N, Fölster J. Problems with the reconciliation of good ecological status and public participation in the Water Framework Directive. *Science of the Total Environment* 2012; 433: 482 - 490.

[46] Sistema Nacional de Informação de Recursos. Classificação dos cursos de água superficiais de acordo com as suas características de qualidade para usos múltiplos. Disponível em http://www.snirh.pt/snirh/_dadossintese/qualidadeanuario/boletim/tabela_classes.php [acedido em 05/03/2014].

- [47] Leal LH, Soeter AM, Kools SAE, Kraak MHS, Parsons JR, Temmink H, et al. Ecotoxicological assessment of grey water treatment systems with *Daphnia magna* and *Chironomus riparius*. *Water Research* 2012; 46: 1038 - 1044.
- [48] Gomes A. Avaliação da Ecotoxicidade de Águas Superficiais - Aplicação à Bacia Hidrográfica do Rio Leça; Dissertação de Mestrado em Engenharia do Ambiente: Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto; 2007.
- [49] Yoo J, Ahn B, Oh JJ, Han T, Kim WK, Kim S, et al. Identification of toxicity variations in a stream affected by industrial effluents using *Daphnia magna* and *Ulva pertusa*. *Journal of Hazardous Materials* 2013; 260: 1042 - 1049.
- [50] González-Pleiter M, Gonzalo S, Rodea-Palomares I, Leganés F, Rosal S, Boltes K, et al. Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. *Water Research* 2013; 47: 2050 - 2064.
- [51] Connell DW, Lam P, Richardson B, Wu R. Introduction to ecotoxicology. 1st ed.: Wiley-Blackwell; 1999.
- [52] Silva A, Figueiredo SA, Sales MG, Delerue-Matos C. Ecotoxicity tests using the green algae *Chlorella vulgaris* - A useful tool in hazardous effluents management. *Journal of Hazardous Materials* 2009; 167: 179 - 185.
- [53] Gomes AI, Pires JCM, Figueiredo SA, Boaventura RAR. Optimization of River Water Quality Surveys by Multivariate Analysis of Physicochemical, Bacteriological and Ecotoxicological Data. *Water Resources Management* 2014; 28: 1345 - 1361.
- [54] Gomes AI, Pires JCM, Figueiredo SA, Boaventura RAR. Multiple linear and principal component regressions for modelling ecotoxicity bioassay response. *Environmental Technology* 2014; 35 (8): 945 - 955.
- [55] Ma XY, Wang XC, Ngo HH, Guo W, Wu MN, Wang N. Reverse osmosis pretreatment method for toxicity assessment of domestic wastewater using *Vibrio qinghaiensis* sp.-Q67. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2013; 97: 248 - 254.

[56] Carvalho MCMCAS. Avaliação da toxicidade de compostos de níquel para o cladóceros *Daphnia magna*, Ensaio *in vivo* e *in vitro*; Dissertação de Mestrado em Controlo de Qualidade: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2000.

[57] Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. 4th ed., EPA United States Environmental Protection Agency; 2002.

[58] Walker CH, Hopkins SP, Sibly RM, Peakall DB. Principles of Ecotoxicology. 2nd ed. Taylor & Francis; 2008.

[59] Reginatto V. Avaliação do Ensaio de Toxicidade com a Alga *Scenedesmus suspicatus* para o Estudo de Efluentes Industriais. Tese de Doutoramento: Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas; 1998.

[60] Rizzo L. Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. Water Research 2011; 45: 4311 - 4340.

[61] Rand GM. Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment. 2nd ed. Taylor & Francis; 1995.

[62] Klaassen C, Watkins III JB. Essentials of Toxicology. 2nd ed. The McGraw-Hill; 2010.

[63] Könnecker G, Regelman J, Belanger S, Gamon K, Sedlak R. Environmental properties and aquatic hazard assessment of anionic surfactants: physico-chemical, environmental fate and ecotoxicity properties: a review. Ecotoxicology and Environmental Safety 2011; 74: 1445 - 1460.

[64] OECD Guidelines for the testing of chemicals. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. Organization for economic cooperation and development; 2011.

[65] Tang JYM, McCarty S, Glenn E, Neale PA, Warne MSJ, Escher BI. Mixture effects of organic micropollutants present in water: Towards the development of effect-based water quality trigger values for baseline toxicity. Water Research 2013; 47: 3300 - 3314.

[66] OECD Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental health and safety publications. Organization for economic cooperation and development; 2000.

[67] Araújo CFC, Souza-Santos LP. Use of the microalgae *Thalassiosira weissflogii* to assess water toxicity in the Suape industrial-port complex of Pernambuco, Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2013; 89: 212 - 221.

[68] Cunha BM. Avaliação ecotoxicológica de distintos tipos de efluentes mediante ensaios de toxicidade aguda utilizando *Artemia salina* e *Lactuca sativa*. Trabalho de conclusão de curso de Química: Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2011.

[69] Non-animal Methods for Toxicity Testing. Disponível em <http://www.alttox.org/ttrc/toxicity-tests/ecotoxicity/> [acedido em 06/03/2014].

[70] Lavorante BRBO, Oliveira DD, Costa BVM, Souza-Santos LP. A new protocol for ecotoxicological assessment of seawater using nauplii of *Tisbe biminiensis* (Copepoda: Harpacticoida). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2013; 95: 52 - 59.

[71] Zurita JL, Jos A, Peso A, Salguero M, López-Artíguez M, Repetto G, Ecotoxicological effects of the antioxidant additive propyl gallate in five aquatic systems. *Water Research* 2007; 41: 2599 - 2611.

[72] Libralato G, Ghirardini AV, Avezzu F. Toxicity removal efficiency of decentralised sequencing batch reactor and ultra-filtration membrane bioreactors. *Water Research* 2010; 44: 4437 - 4450.

[73] *Vibrio fischeri*. Disponível em http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Vibrio_fischeri [acedido em 11/01/2014].

[74] Lee SY, Kang HJ, Kwon JH. Toxicity cutoff of aromatic hydrocarbons for luminescence inhibition of *Vibrio fischeri*. *Ecotoxicology and environmental safety* 2013; 94: 116 - 122.

[75] *Selenastrum capricornutum*. Disponível em <http://ztopics.com/Selenastrum/> [acedido em 11/01/2014].

[76] *Scenedesmus subspicatus*. Disponível em <http://www.vustah.cz/en/zlatelab.htm> [acesso em 11/01/2014].

[77] Corrêa AXR. Desenvolvimento de um método de imobilização/conservação de algas utilizadas em testes de ecotoxicidade; Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental: Universidade do Vale do Itajaí, Brasil; 2006.

[78] *Lemna minor*. Disponível em http://en.wikipedia.org/wiki/Lemna_minor [acesso em 11/01/2014].

[79] Tatarazako N, Oda S. The water flea *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) as a test species for screening and evaluation of chemicals with endocrine disrupting effects on crustaceans. *Ecotoxicology* 2007; 16: 197 - 203.

[80] *Daphnia magna*. Disponível em <http://www.auda.org.uy/daphnia.html> [acesso em 11/01/2014].

[81] *Artemia salina*. Disponível em <http://ftbettas.blogspot.pt/2009/10/artemia-salina.html> [acesso em 11/01/2014].

[82] *Danio rerio*. Disponível em <http://www.fishtanksandponds.co.uk/galleries/photo-pages-fw-tropical/cypriniformes/danio-rerio-zebra-danio.html> [acesso em 11/01/2014].

[83] *Oncorhynchus mykiss*. Disponível em <http://www.paulodastrutas.com.br/index.php?link=6> [acesso em 11/01/2014].

[84] Freshwater chronic toxicity test procedure and protocol. USEPA Region 1; 2007.

[85] Ventura SPM, Silva FA, Gonçalves AMM, Pereira JL, Gonçalves F, Coutinho JAP. Ecotoxicity analysis of cholinium-based ionic liquids to *Vibrio fischeri* marine bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2014; 102: 48 - 54.

[86] Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território. Decreto-Lei n.º 98/2010 de 11 de Agosto. Diário da República. 1ª Série, nº 155, 3353 - 3398.

[87] Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território. Decreto-Lei n.º 127/2013 de 30 de agosto. Diário da República. 1ª Série, nº 167, 5324 - 5389.

[88] Agência Portuguesa do Ambiente. Disponível em www.apambiente.pt [acedido em 25/10/2013].

[89] Mendonça E, Picado A, Paixão SM, Silva L, Cunha MA, Leitão S, et al. Ecotoxicity tests in the environmental analysis of wastewater treatment plants: Case study in Portugal. *Journal of Hazardous Materials* 2009; 163: 665 - 670.

[90] Shaw IC, Chadwick J. *Principles of Environmental Toxicology*. Taylor & Francis; 1998.

[91] Bragança I, Plácido A, Paíga P, Domingues VF, Delerue-Matos C. QuEChERS: A new sample preparation approach for the determination of ibuprofen and its metabolites in soils. *Science of the Total Environment* 2012; 433: 281 - 289.

[92] Han S, Choi K, Kim J, Ji K, Kim S, Ahn B, et al. Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. *Aquatic Toxicology* 2010; 98: 256 - 264.

[93] Harada A, Komori K, Nakada N, Kitamura K, Suzuki Y. Biological effects of PPCPs on aquatic lives and evaluation of river waters affected by different wastewater treatment levels. *Water Science & Technology* 2008; 1541 - 1546.

[94] Rocco L, Frenzilli G, Fusco D, Peluso C, Stingo V. Evaluation of zebrafish DNA integrity after exposure to pharmacological agents present in aquatic environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2010; 73: 1530 - 1536.

[95] Cid JFLS. Contribuição para o estudo de sistemas de tratamento de água para abastecimento associados à remoção de compostos farmacêuticos. Dissertação de Mestrado em Engenharia do Ambiente, perfil Engenharia Sanitária: Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa; 2011.

[96] Pomati F, Netting AG, Calamari D, Neilan BA. Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp. and *Lemna minor*. *Aquatic Toxicology* 2004; 67: 387 - 396.

[97] Flippin JL, Huggett D, Foran CM. Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Aquatic Toxicology* 2007; 81: 73 - 78.

[98] Mendes FR, Moreira BSS, Cortez FS, Santos AR, César A. Avaliação do efeito agudo dos fármacos ibuprofeno e diclofenaco através de teste de toxicidade com *Daphnia similis*. *Revista Ceciliana* 2010; 2: 9 - 12.

[99] Santos LHMLM, Gros M, Rodriguez-Mozaz S, Delerue-Matos C, Pena A, Barceló D, et al. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Science of the Total Environment* 2013; 461 - 462: 302 - 316.

[100] Grossberger A, Hadar Y, Borch T, Chefetz B. Biodegradability of pharmaceutical compounds in agricultural soils irrigated with treated wastewater. *Environmental Pollution* 2014; 185: 168 - 177.

[101] Estevez E, Hernandez-Moreno JM, Fernandez-Vera JR, Palacios-Diaz MP. Ibuprofen adsorption in four agricultural volcanic soils. *Science of the Total Environment* 2014; 468 - 469: 406 - 414.

[102] Jjemba PK. Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2006; 63: 113 - 130.

[103] Li WC. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil: a review. *Environmental Pollution* 2014; 187: 193 - 201.

[104] Bouissou-Schurtz C, Houeto P, Guerbet M, Bachelot M, Casellas C, Mauclair A-C et al. Ecological risk assessment of the presence of pharmaceutical residues in a French national water survey. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2014; 69: 296 - 303.

[105] Santos LHMLM, Araújo AN, Fachini A, Pena A, Delerue-Matos C, Montenegro MCBSM. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment: a review. *Journal of Hazardous Materials* 2010; 175: 45 - 95.

[106] Backhaus T, Karlsson M. Screening level mixture risk assessment of pharmaceuticals in STP effluents. *Water Research* 2014; 49: 157 - 165.

[107] Paíga P, Santos LHMLM, Amorim CG, Araújo AN, Montenegro MCBSM, Pena A, et al. Pilot monitoring study of ibuprofen in surface waters of north of Portugal. *Environmental Science and Pollution Research* 2013; 20: 2410 - 2420.

[108] Durán-Álvarez JC, Prado B, Ferroud A, Juayerk N, Jiménez-Cisneros B. Sorption, desorption and displacement of ibuprofen, estrone, and 17 β estradiol in wastewater irrigated and rainfed agricultural soils. *Science of the Total Environment* 2014; 473 - 474: 189 -198.

[109] Parolini M, Binelli A, Provini A. Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2011; 74: 1586 - 1594.

[110] Directiva 92/18/CEE da Comissão de 20 de Março de 1992, que altera o anexo da Directiva 81/852/CEE do conselho, relativa à aproximação das legislações dos Estados-membros respeitantes às normas e protocolos analíticos, tóxico-farmacológicos e clínicos em matéria de ensaio de medicamentos veterinários. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*.

[111] Directiva 2001/83/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 6 de Novembro de 2001, que estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos para uso humano. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*.

[112] Directiva 2004/27/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 31 de Março de 2004, que altera a Directiva 2001/83/CE, que estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos para uso humano. *Jornal Oficial da União Europeia*.

[113] Directiva 93/67/CEE da Comissão, de 20 de Julho de 1993 que estabelece os princípios para a avaliação dos riscos para o homem e para o ambiente das substâncias

notificadas em conformidade com a Directiva 67/548/CEE do Conselho. Jornal Oficial da União Europeia.

[114] Cleuvers M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters* 2003; 142: 185 - 194.

[115] Ibuprofen. Disponível em www.medicinescomplete.com [acedido em 11/05/2014].

[116] Gálico DA, Holanda BBC, Guerra RB, Legendre AO, Rinaldo D, Treu-Filho O, et al. Thermal and spectroscopic studies on solid ibuprofen complexes of lighter trivalent lanthanides. *Thermochimica Acta* 2014; 575: 226 - 232.

[117] Palma CD, Paola RD, Perrotta C, Mazzon E, Cattaneo D, Trabucchi E, et al. Ibuprofen–arginine generates nitric oxide and has enhanced anti-inflammatory effects. *Pharmacological Research* 2009; 60: 221 - 228.

[118] Ericson H, Thorsén G, Kumblad L. Physiological effects of diclofenac, ibuprofen and propranolol on Baltic Sea blue mussels. *Aquatic Toxicology* 2010; 99: 223 - 231.

[119] Pounds N, Maclean S, Webley M, Pascoe D, Hutchinson T. Acute and chronic effects of ibuprofen in the mollusc *Planorbis carinatus* (*Gastropoda: Planorbidae*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2008; 70: 47 - 52.

[120] Ferrando-Climent L, Collado N, Buttiglieri G, Gros M, Rodriguez-Roda I, Rodriguez-Mozaz S, Barceló D. Comprehensive study of ibuprofen and its metabolites in activated sludge batch experiments and aquatic environment. *Science of the Total Environment* 2012; 438: 404 - 413.

[121] Figueiredo PLM. Adsorção de ibuprofeno e ácido clofibríco em carvões activados; Dissertação de Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica: Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa; 2012.

[122] Wu C, Huang X, Witter JD, Spongberg AL, Wang K, Wang D, Liu J. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products and associated environmental risks in the central and lower Yangtze river, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2014, 106: 19 - 26.

[123] Zhu S, Chen H, Li J. Sources, distribution and potential risks of pharmaceuticals and personal care products in Qingshan Lake basin, Eastern China. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2013; 96: 154 - 159.

[124] Stempvoort DRV, Roy JW, Grabuski J, Brown SJ, Bickerton G, Sverko E. An artificial sweetener and pharmaceutical compounds as co-tracers of urban wastewater in groundwater. *Science of the Total Environment* 2013; 461 - 462: 348 - 359.

[125] Fang T-H, Nan F-H, Chin TS, Feng H-M. The occurrence and distribution of pharmaceutical compounds in the effluents of a major sewage treatment plant in Northern Taiwan and the receiving coastal waters. *Marine Pollution Bulletin* 2012; 64: 1435 - 1444.

[126] Martín J, Camacho-Muñoz D, Santos JL, Aparicio I, Alonso E. Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: Removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal. *Journal of Hazardous Materials* 2012; 15: 40 - 47.

[127] Breitholtz M, Näslund M, Stråe D, Borg H, Grabic R, Fick J. An evaluation of free water surface wetlands as tertiary sewage water treatment of micro-pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2012; 78: 63 - 71.

[128] Kleywegt S, Pileggi V, Yang P, Hao C, Zhao X, Rocks C, Thach S, Cheung P, Whitehead P. Pharmaceuticals, hormones and bisphenol A in untreated source and finished drinking water in Ontario, Canada – Occurrence and treatment efficiency. *Science of The Total Environment* 2011; 409: 1481 - 1488.

[129] Loos R, Locoro G, Comero S, Contini S, Schwesig D, Werres F, et al. Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. *Water Research* 2010; 44: 4115 - 4126.

[130] Lin AY-C, Tsai Y-T. Occurrence of pharmaceuticals in Taiwan's surface waters: Impact of waste streams from hospitals and pharmaceutical production facilities. *Science of the Total Environment* 2009; 407: 3793 - 3802.

[131] Kim J-W, Ishibashi H, Yamauchi R, Ichikawa N, Takao Y, Hirano M, et al. Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*). *The Journal of Toxicological Sciences* 2009; 34 (2): 227 - 232.

[132] Pailler J-Y, Krein A, Pfister L, Hoffmann L, Guignard C. Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg. *Science of the Total Environment* 2009; 407: 4736 - 4743.

[133] Bueno MJM, Agüera A, Hernando MD, Gómez MJ, Fernández-Alba AR. Evaluation of various liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry operation modes applied to the analysis of organic pollutants in wastewaters. *Journal of Chromatography A* 2009; 1216: 5995 - 6002.

[134] Terzić S, Senta I, Ahel M, Gros M, Petrović M, Barcelo D, et al. Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region. *Science of the Total Environment* 2008; 399: 66 - 77.

[135] Barnes KK, Kolpin DW, Furlong ET, Zaugg SD, Meyer MT, Barber LB. A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States — I) Groundwater. *Science of the Total Environmental* 2008; 402: 192 - 200.

[136] Roberts PH, Thomas KV. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Science of the Total Environment* 2006; 356: 143 - 153.

[137] Hernando MD, Heath E, Petrovic M, Barceló D. Trace-level determination of pharmaceutical residues by LC-MS/MS in natural and treated waters. A pilot-survey study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2006; 385: 985 - 991.

[138] Gómez MJ, Petrović M, Fernández-Alba AR, Barceló D. Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *Journal of Chromatography A* 2006; 1114: 224 - 233.

[139] Calamari D, Zuccato E, Castiglioni S, Bagnati R, Fanelli R. Strategic Survey of Therapeutic Drugs in the Rivers Po and Lambro in Northern Italy. *Environmental Science & Technology* 2003; 37: 1241 - 1248.

[140] Hilton MJ, Thomas KV. Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2003; 1015: 129 - 141.

[141] Gómez MJ, Bueno MJM, Lacorte S, Fernández-Alba AR, Agüera A. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere* 2007; 66: 993 - 1002.

[142] Verenitch SS, Lowe CJ, Mazumder A. Determination of acidic drugs and caffeine in municipal wastewaters and receiving waters by gas chromatography–ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2006; 1116: 193 - 203.

[143] Nakada N, Tanishima T, Shinohara H, Kiri K, Takada H. Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. *Water Research* 2006; 40: 3297 - 3303.

[144] Moldovan Z. Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania. *Chemosphere* 2006; 64: 1808 - 1817.

[145] Tauxe-Wuersch A, Alencastro LF, Grandjean D, Tarradellas J. Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment. *Water Research* 2005; 39: 1761 - 1772.

[146] Lee H-B, Peart TE, Svoboda ML. Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2005; 1094: 122 - 129.

[147] Bendz D, Paxéus NA, Ginn TR, Loge FJ. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden. *Journal of Hazardous Materials* 2005; 122: 195 - 204.

[148] Weigel S, Kallenborn R, Hühnerfuss H. Simultaneous solid-phase extraction of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2004; 1023: 183 - 195.

[149] Thomas PM, Foster GD. Determination of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs, Caffeine, and Triclosan in Wastewater by Gas Chromatography – Mass Spectrometry. *Journal of Environmental Science and Health Part A — Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* 2004; A39 (8): 1969 - 1978.

[150] Stumpf M, Ternes TA, Wilken R-D, Rodrigues SV, Baumann W. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *The Science of the Total Environment* 1999; 225: 135 - 141.

[151] Cleuvers M. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2004; 59: 309 - 315.

[152] Heckmann L-H, Callaghan A, Hooper HL, Connon R, Hutchinson TH, Maund SJ, et al. Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: Effects on life history traits and population dynamics. *Toxicology Letters* 2007; 172: 137 - 145.

[153] Lange HJ, Noordoven W, Murk AJ, Lüring M, Peeters ETHM. Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 2006; 78: 209 - 216.

[154] Pounds N, Maclean S, Webley M, Pascoe D, Hutchinson T. Acute and chronic effects of ibuprofen in the mollusc *Planorbis carinatus* (Gastropoda: Planorbidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2008; 70: 47 - 52.

[155] Quinn B, Gagné F, Blaise G. An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuate*. *Science of the Total Environment* 2008; 389: 306 - 314.

[156] Carvalho F, Guilhermino L, Ribeiro R, Gonçalves F, Soares AMVM. METIER (Modular Ecotoxicity Tests Incorporating Ecological Relevance). II. Ecotoxicity of Poorly Water-Soluble Compounds: Concentration versus Dose. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 1995; 29: 431 - 434.

[157] Jenway 6405 Scanning Spectrophotometer. Disponível em www.good17.com.cn [acesso em 19/05/2014].

- [158] Counting chamber BLAUBRAND Neubauer improved. Disponível em <http://www4.ujaen.es/~ialgarra/NeubauerDocencia.swf> [acedido em 19/05/2014].
- [159] pH meter CRISON Model: GLP 21. Disponível em www.uv.es [acedido em 19/09/2014].
- [160] High-performance liquid chromatograph Prominence Shimadzu. Disponível em www.ssi.shimadzu.com [acedido em 19/05/2014].
- [161] Warne MSJ, Dam R. NOEC AND LOEC data should no longer be generated or used. *Australasian Journal of Ecotoxicology* 2008; 14: 1 - 5.
- [162] Ma J, Lin F, Zhang R, Yu W, Lu N. Differential sensitivity of two green algae, *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella vulgaris*, to 14 pesticide adjuvants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2004; 58: 61 - 67.

A. Condições experimentais testadas

A.1. Construção da reta de calibração

Tabela A.1 – Volumes utilizados nas diluições de alga.

V_{alga} (mL)	$V_{\text{água}}$ (mL)
0	50
1	49
5	45
10	40
20	30
25	25
50	0

A.2. Ensaio de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$)

Tabela A.2 – Volumes utilizados no ensaio de $K_2Cr_2O_7$ com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

$[K_2Cr_2O_7]$ (mg/L)	$V_{K_2Cr_2O_7}$ (mL)	V_{alga} (mL)	$V_{\text{meio cultura}}$ (mL)
0	0	10	90
0,25	2,5	10	87,5
0,5	5	10	85
1	10	10	80
2	20	10	70
4	40	10	50

Tabela A.3 – Volumes utilizados no ensaio de $K_2Cr_2O_7$ com a alga *Chlorella vulgaris*.

$[K_2Cr_2O_7]$ (mg/L)	$V_{K_2Cr_2O_7}$ (mL)	V_{alga} (mL)	$V_{\text{meio cultura}}$ (mL)
0	0	10	90
0,0625	0,625	10	89,375
0,125	1,25	10	88,75
0,25	2,5	10	87,5
0,5	5	10	85
1	10	10	80

A.3. Ensaio de ibuprofeno (IBU)

Tabela A.4 – Volumes utilizados no ensaio de ibuprofeno com as algas *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*.

[IBU] (mg/L)	V _{IBU} (mL)	V _{alga} (mL)	V _{meio cultura} (mL)
0	0	10	90
4	10	10	80
10	25	10	65
20	50	10	40
30	75	10	15
36	90	10	0

A.4. Ensaio de metabolitos

Tabela A.5 – Volumes utilizados nos ensaios de carboxi-ibuprofeno e 2-hidroxi-ibuprofeno com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

[metabolito] (mg/L)	V _{metabolito} (mL)	V _{alga} (mL)	V _{meio cultura} (mL)
0	0	10	90
1	5	10	85
2	10	10	80
4	20	10	70
8	40	10	50

Tabela A.6 – Volumes utilizados nos ensaios de carboxi-ibuprofeno e 2-hidroxi-ibuprofeno com a alga *Chlorella vulgaris*.

[metabolito] (mg/L)	V _{metabolito} (mL)	V _{alga} (mL)	V _{meio cultura} (mL)
0	0	10	90
0,5	2,5	10	87,5
1	5	10	85
2	10	10	80
4	20	10	70
8	40	10	50

B. Ensaio de ecotoxicidade

B.1. Ensaio com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*

B.1.1. Ensaio de dicromato de potássio

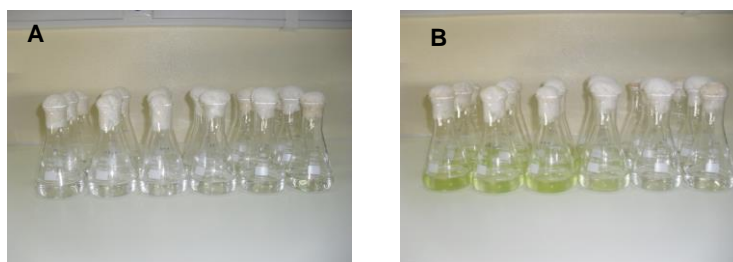


Figura B.1 – Ensaio de dicromato de potássio com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*:
A) Início; B) Fim.

B.1.2. Ensaio de ibuprofeno

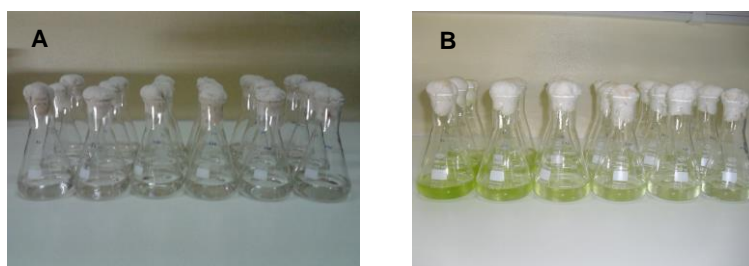


Figura B.2 – Ensaio de ibuprofeno com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*:
A) Início; B) Fim.

B.1.3. Ensaio de carboxi-ibuprofeno

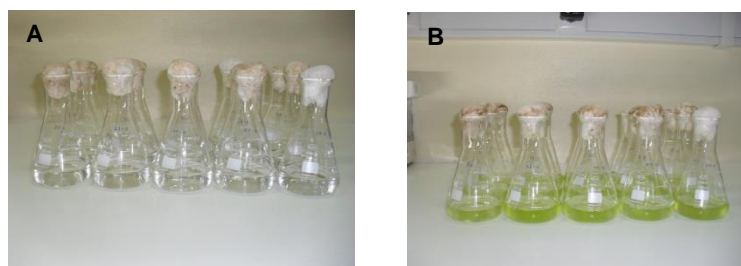


Figura B.3 – Ensaio de carboxi-ibuprofeno com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*:
A) Início; B) Fim.

B.1.4. Ensaio de 2-hidroxi-ibuprofeno

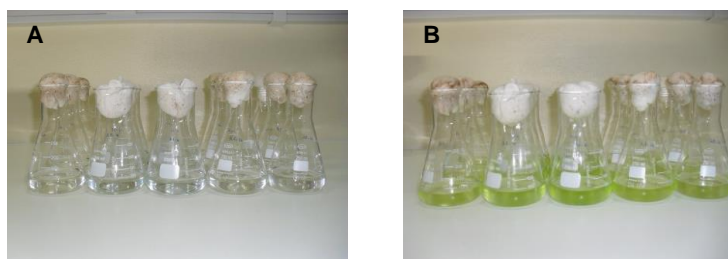


Figura B.4 – Ensaio de 2-hidroxi-ibuprofeno com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*:
A) Início; B) Fim.

B.2. Ensaio com a alga *Chlorella vulgaris*

B.2.1. Ensaio de dicromato de potássio

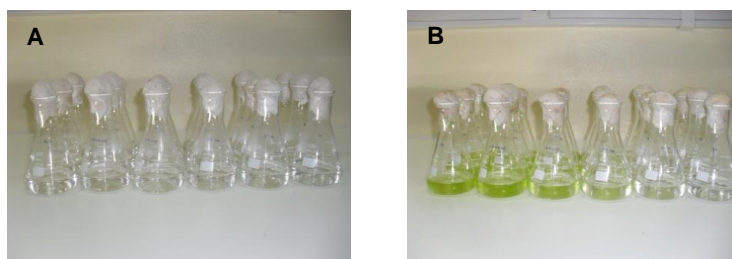


Figura B.5 – Ensaio de dicromato de potássio com a alga *Chlorella vulgaris*:
A) Início; B) Fim.

B.2.2. Ensaio de ibuprofeno

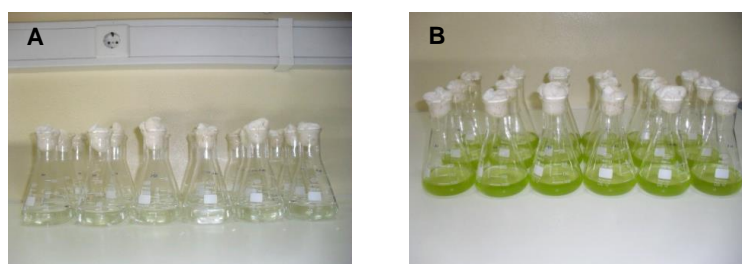


Figura B.6 – Ensaio de ibuprofeno com a alga *Chlorella vulgaris*:
A) Início; B) Fim.

B.2.3. Ensaio de carboxi-ibuprofeno

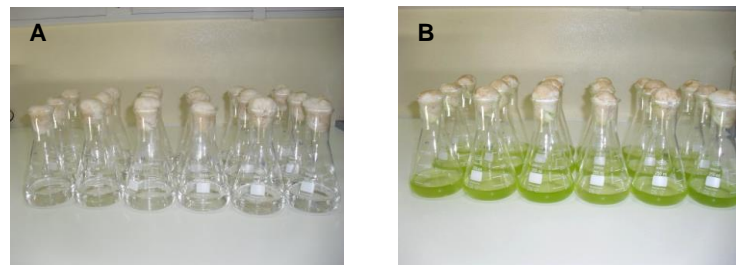


Figura B.7 – Ensaio de carboxi-ibuprofeno com a alga *Chlorella vulgaris*:
A) Início; B) Fim.

B.2.4. Ensaio de 2-hidroxi-ibuprofeno

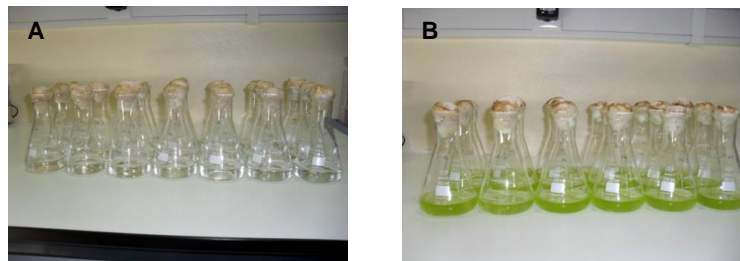


Figura B.8 – Ensaio de 2-hidroxi-ibuprofeno com a alga *Chlorella vulgaris*:
A) Início; B) Fim.

C. Resultados experimentais

C.1. Ensaio com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*

Tabela C.1 – Resultados obtidos no ensaio de dicromato de potássio com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Concentração inicial (mg/L)	pH inicial	pH final	Absorvância inicial	Absorvância final	% inibição (média)
0	7,27	8,17	0,013	0,170	
		7,97	0,012	0,167	
		8,51	0,012	0,166	
0,25	7,63	8,76	0,017	0,148	16,7
		8,23	0,019	0,147	
		8,14	0,016	0,145	
0,5	7,68	9,00	0,014	0,131	24,9
		8,25	0,014	0,130	
		8,88	0,012	0,129	
1	7,78	8,26	0,013	0,098	46,6
		8,75	0,015	0,099	
		8,71	0,019	0,099	
2	7,92	7,22	0,017	0,047	80,9
		7,71	0,018	0,049	
		7,76	0,017	0,045	
4	8,15	7,46	0,019	0,039	87,6
		7,59	0,019	0,038	
		7,63	0,019	0,038	

Tabela C.2 – Resultados obtidos no ensaio de ibuprofeno com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Concentração inicial (mg/L)	Concentração final (mg/L)	pH inicial	pH final	Absorvância inicial	Absorvância final	% inibição (média)
0	0		7,07	0,015	0,327	
0	0	7,22	7,23	0,014	0,335	
0	0		7,34	0,017	0,324	
3,9	3,6		7,13	0,019	0,230	
4,0	4,1	7,45	7,33	0,019	0,253	29,4
3,8	3,8		7,37	0,017	0,236	
10,3	10,2		7,44	0,020	0,178	
9,6	9,4	7,40	7,30	0,018	0,177	46,2
9,3	9,7		7,46	0,018	0,207	
20,4	19,9		7,35	0,025	0,133	
18,6	18,7	7,35	7,35	0,027	0,121	68,1
18,6	18,2		7,34	0,027	0,125	

Avaliação da Ecotoxicidade do Ibuprofeno e seus Metabólitos usando Microalgas - Anexos

29,1	28,9		7,25	0,027	0,115	
28,3	29,1	7,33	7,28	0,026	0,095	74,9
28,3	28,2		7,27	0,035	0,114	
34,3*	30,9*		7,26*	0,032*	0,096*	
33,4	33,3	7,26	7,29	0,030	0,091	78,1
33,1	33,5		7,27	0,030	0,106	

* Ensaio não considerado devido a não obedecer os critérios de qualidade.

Tabela C.3 – Resultados obtidos no ensaio de carboxi-ibuprofeno com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Concentração inicial (mg/L)	Concentração final (mg/L)	pH inicial	pH final	Absorvância inicial	Absorvância final	% inibição (média)
0	0		6,84	0,015	0,325	
0	0	7,35	7,18	0,016	0,323	
0	0		7,25	0,015	0,328	
0,8	1,0		8,80	0,015	0,310	
1,0	1,0	7,51	7,27	0,015	0,311	5,27
1,0	1,0		7,86	0,014	0,304	
2,3	2,4		8,08	0,015	0,283	
2,0	2,0	7,51	8,07	0,014	0,285	12,58
2,0	2,0		8,43	0,013	0,287	
4,5	4,5		7,97	0,013	0,233	
4,0	4,0	7,47	8,03	0,012	0,238	27,74
3,9	3,9		7,84	0,010	0,236	
8,8	9,2		7,49	0,011	0,253	
8,0	7,8	7,23	7,29	0,013	0,259	20,86
7,7	7,9		7,61	0,010	0,258	

Tabela C.4 – Resultados obtidos no ensaio de 2-hidroxi-ibuprofeno com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Concentração inicial (mg/L)	Concentração final (mg/L)	pH inicial	pH final	Absorvância inicial	Absorvância final	% inibição (média)
0	0		6,84	0,015	0,325	
0	0	7,35	7,18	0,016	0,323	
0	0		7,25	0,015	0,328	
1,2	1,1		7,73	0,011	0,259	
1,0	1,1	7,57	7,72	0,014	0,259	21,18
1,1	1,1		7,79	0,013	0,253	
2,1	2,2		7,76	0,013	0,273	
2,1	2,1	7,67	7,84	0,012	0,280	14,95
2,1	2,1		7,69	0,012	0,275	
4,2	4,3		7,81	0,014	0,272	
4,1	4,1	7,63	7,85	0,013	0,270	16,88
4,1	4,1		7,79	0,013	0,271	

8,3	8,3		7,76	0,013	0,230	
8,1	8,2	7,71	7,82	0,012	0,233	29,46
8,2	8,1		8,04	0,013	0,231	

C.2. Ensaio com a alga *Chlorella vulgaris*

Tabela C.5 – Resultados obtidos no ensaio de dicromato de potássio com a alga *Chlorella vulgaris*.

Concentração inicial (mg/L)	pH inicial	pH final	Absorvância inicial	Absorvância final	% inibição (média)
0	7,38	7,21	0,011	0,255	
		7,23	0,012	0,231	
		7,20	0,011	0,268	
0,0625	7,35	7,16	0,018	0,210	19,6
		7,18	0,011	0,204	
		7,15	0,011	0,205	
0,125	7,44	7,17	0,015	0,125	51,4
		7,13	0,011	0,132	
		7,17	0,012	0,131	
0,25	7,45	7,21	0,014	0,082	71,1
		7,23	0,010	0,085	
		7,25	0,017	0,082	
0,5	7,51	7,37	0,009	0,042	86,0
		7,38	0,008	0,041	
		7,38	0,011	0,046	
1	7,48	7,45	0,009	0,028	92,1
		7,42	0,011	0,029	
		7,39	0,009	0,029	

Tabela C.6 – Resultados obtidos no ensaio de ibuprofeno com a alga *Chlorella vulgaris*.

Concentração inicial (mg/L)	Concentração final (mg/L)	pH inicial	pH final	Absorvância inicial	Absorvância final	% inibição (média)
0	0		7,08	0,012	0,440	
0	0	7,47	7,24	0,012	0,406	
0	0		7,26	0,012	0,433	
3,1	4,4		7,26	0,015	0,336	
3,9	3,9	7,62	7,18	0,016	0,437	11,7
3,9	4,0		7,19	0,016	0,371	
10,6	10,9		7,28	0,015	0,382	
9,8	9,6	7,88	7,54	0,015	0,386	14,0
9,5	9,6		7,34	0,017	0,348	

Avaliação da Ecotoxicidade do Ibuprofeno e seus Metabolitos usando Microalgas - Anexos

20,3	21,8		7,13	0,015	0,448	
19,1	20,0	7,48	7,15	0,016	0,416	0,9
19,0	18,9		7,08	0,016	0,415	
28,2	27,8		7,02	0,016	0,366	
26,8	27,3	7,34	7,16	0,017	0,396	13,4
29,8	29,0		7,08	0,017	0,365	
36,1	37,0		7,02	0,014	0,401	
34,6	34,9	7,34	7,03	0,014	0,390	7,2
34,1	35,4		7,02	0,015	0,405	

Tabela C.7 – Resultados obtidos no ensaio de carboxi-ibuprofeno com a alga *Chlorella vulgaris*.

Concentração inicial (mg/L)	Concentração final (mg/L)	pH inicial	pH final	Absorvância inicial	Absorvância final	% inibição (média)
0	0		7,01	0,012	0,401	
0	0	7,38	7,19	0,013	0,403	
0	0		7,17	0,012	0,397	
0,8	0,9		7,40	0,019	0,385	
0,7	0,8	7,59	7,42	0,016	0,373	3,9
0,7	0,8		7,54	0,016	0,412	
1,5	1,7		7,53	0,017	0,337	
1,3	1,3	7,54	7,63	0,019	0,341	17,9
1,4	1,4		7,50	0,019	0,333	
3,1	2,8		8,10	0,016	0,298	
2,7	2,7	7,48	7,98	0,022	0,379	19,1
2,7	2,7		7,63	0,019	0,322	
5,7	5,5		7,47	0,018	0,391	
5,2	5,2	7,46	7,61	0,017	0,344	10,1
5,2	5,2		7,63	0,018	0,365	
10,9	11,5		7,45	0,019	0,307	
10,4	10,6	7,92	7,49	0,019	0,351	19,3
10,4	11,5		7,39	0,018	0,337	

Tabela C.8 – Resultados obtidos no ensaio de 2-hidroxi-ibuprofeno com a alga *Chlorella vulgaris*.

Concentração inicial (mg/L)	Concentração final (mg/L)	pH inicial	pH final	Absorvância inicial	Absorvância final	% inibição (média)
0	0		7,80	0,017	0,429	
0	0	7,25	7,30	0,013	0,443	
0	0		7,91	0,013	0,433	
0,5	0,5		7,34	0,025	0,371	
0,5	0,5	7,40	7,32	0,025	0,397	13,9
0,5	0,5		8,61	0,023	0,392	

1,0	1,1	8,06	0,022	0,402	
1,0	1,0	7,42	7,66	0,020	0,385
1,0	1,0	7,40	0,019	0,393	11,3
2,0	2,1	7,42	0,013	0,396	
2,0	2,0	7,48	7,60	0,010	0,397
2,0	2,0	7,40	0,012	0,379	9,9
4,0	3,9	7,84	0,011	0,370	
3,9	4,0	7,46	7,49	0,013	0,380
3,9	3,6	8,36	0,024	0,390	13,5
7,8	7,7	7,59	0,015	0,377	
7,8	7,9	7,41	7,38	0,014	0,404
7,9	8,2	8,29	0,016	0,400	10,0

C.3. Exemplo de um cromatograma

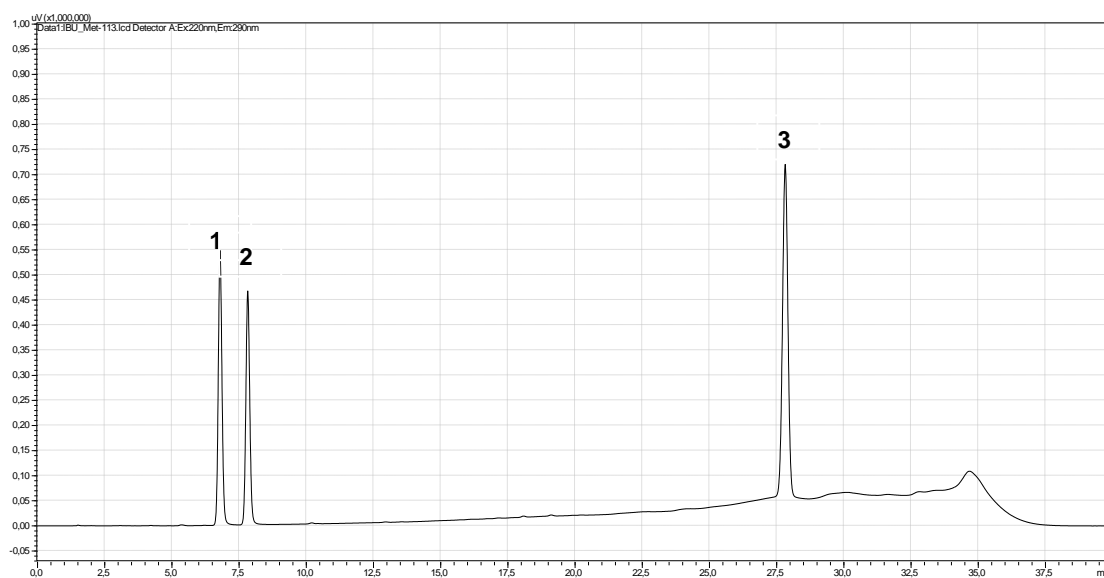


Figura C.1 – Exemplo de um cromatograma obtido para uma mistura de padrões com concentração individual de 4 mg/L. 1 – 2-hidroxi-ibuprofeno; 2 – carboxi-ibuprofeno; 3 – ibuprofeno.

D. Exemplo da análise de dados do teste de dicromato de potássio com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*

D.1. Resposta do crescimento algal em função da concentração de substância de referência

Tabela D.1 – Crescimento algal em função da concentração de substância e respetiva transformação logarítmica.

		Concentração de dicromato de potássio (mg/L)					
	Réplica	Controlo	0,25	0,5	1	2	4
Crescimento algal	A	78500	65500	58500	42500	15000	10000
	B	77500	64000	58000	42000	15500	9500
	C	77000	64500	58500	40000	14000	9500
	Média	77666,7	64666,7	58333,3	41500,0	14833,3	9666,7
Transformação Log10	A	4,895	4,816	4,767	4,628	4,176	4,000
	B	4,889	4,806	4,763	4,623	4,190	3,978
	C	4,886	4,810	4,767	4,602	4,146	3,978
	Média (\bar{Y}_i)	4,890	4,811	4,766	4,618	4,171	3,985

D.2. Teste de Shapiro-Wilk

Tabela D.2 – Observações centradas para o teste de Shapiro-Wilk e valor de D calculado.

Concentração de dicromato de potássio (mg/L)							
Réplica	Controlo	0,25	0,5	1	2	4	D
A	-0,012	0,006	0,001	0,010	0,005	0,015	0,0020
B	-0,001	-0,004	-0,002	0,005	0,019	-0,007	
C	-0,004	-0,001	0,001	-0,016	-0,025	-0,007	

Tabela D.3 – Observações centradas ordenadas para o Teste de Shapiro-Wilk.

i	X(i)	i	X(i)
1	-0,025	10	-0,001
2	-0,016	11	0,001
3	-0,012	12	0,001
4	-0,007	13	0,005
5	-0,007	14	0,005
6	-0,004	15	0,006
7	-0,004	16	0,010
8	-0,002	17	0,015
9	-0,001	18	0,019

Tabela D.4 – Coeficientes (ai) e diferenças ($X^{(n-i+1)}-X^{(i)}$) para o Teste de Shapiro-Wilk e valor de W calculado.

i	ai	$X^{(n-i+1)}-X^{(i)}$	W
1	0,4886	0,044	X(18)-X(1)
2	0,3253	0,031	X(17)-X(2)
3	0,2553	0,022	X(16)-X(3)
4	0,2027	0,013	X(15)-X(4)
5	0,1587	0,012	X(14)-X(5)
6	0,1197	0,009	X(13)-X(6)
7	0,0837	0,005	X(12)-X(7)
8	0,0496	0,003	X(11)-X(8)
9	0,0163	0,000	X(10)-X(9)

Para um nível de significância de 0,01 e 18 observações centradas, o valor crítico é de 0,858 (valor tabelado). O valor de W calculado é superior ao valor crítico, o que indica que os dados têm uma distribuição normal.

D.3. Teste de Bartlett

$$B = \frac{[(\sum_{i=1}^p V_i) \ln \bar{S}^2 - \sum_{i=1}^p V_i \ln S_i^2]}{C}$$

$$B = \frac{12 \times \ln(0,0002) - 2 \times (-57,1065)}{1,194} \Leftrightarrow B = 8,012$$

O valor crítico para um nível de significância de 0,01 e 5 graus de liberdade é de 15,09. Sendo o valor de B calculado inferior ao valor crítico, há homogeneidade de variância.

D.4. Teste de Dunnett

Tabela D.5 – Valores de t_i calculados.

Concentração de dicromato de potássio (mg/L)	i	t_i
0,25	2	7,876
0,5	3	12,306
1	4	26,959
2	5	71,216
4	6	89,600

O valor crítico para um nível de significância de 0,05, 12 graus de liberdade e 5 concentrações excluindo o controle é de 2,5. Como o valor de t_i é superior ao valor crítico, as concentrações testadas têm significativamente menor número de células do que o controle, não sendo possível determinar o valor de CEO e CENO.

E. Resultados da análise dos dados de ecotoxicidade

Tabela E.1 – Parâmetros obtidos na análise dos dados de ecotoxicidade.

Ensaio	Parâmetro	Concentrações testadas (mg/L)						
		Controlo	0,25	0,5	1	2	4	
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	dicromato de potássio	Y _{médio}	77667	64667	58333	41500	14833	9667
		Log ₁₀	4,890	4,811	4,766	4,618	4,171	3,985
		Teste de normalidade de Shapiro-Wilk	W	0,961				
		Teste de homogeneidade de variância de Bartlett	B	8,012				
	ibuprofeno	Controlo		3,9	9,7	19,2	28,6	33,3
		Y _{médio}	156667	110667	84333	50000	39333	22833
		Log ₁₀	5,195	5,044	4,924	4,698	4,593	4,532
		Teste de normalidade de Shapiro-Wilk	W	0,807*				
		Teste de homogeneidade de variância de Bartlett	B	3,654				
		Controlo		0,9	2,1	4,2	8,2	
carboxi-ibuprofeno	Y _{médio}	155000	146833	135500	112000	122667		
	Log ₁₀	5,190	5,167	5,132	5,049	5,089		
	Teste de normalidade de Shapiro-Wilk	W	0,808*					
	Teste de homogeneidade de variância de Bartlett	B	1,233					
2-hidroxi-ibuprofeno	Controlo		1,1	2,1	4,1	8,2		
	Y _{médio}	155000	122167	131833	128833	109333		
	Log ₁₀	5,190	5,087	5,120	5,110	5,039		
	Teste de normalidade de Shapiro-Wilk	W	0,822*					
	Teste de homogeneidade de variância de Bartlett	B	5,868					

* Não obedece ao critério de distribuição normal.

Tabela E.1 (continuação)

		Controlo	0,0625	0,125	0,25	0,5	1		
<i>Chlorella vulgaris</i>	dicromato de potássio	Y _{médio}	2400000	1930000	1166667	693333	336667	190000	
		Log ₁₀	6,379	6,286	6,067	5,840	5,527	5,278	
		Teste de normalidade de Shapiro-Wilk	W	0,981					
		Teste de homogeneidade de variância de Bartlett	B	7,936					
	ibuprofeno	Controlo		3,6	10,0	19,5	28,3	34,9	
		Y _{médio}	4143333	3656667	3563333	4106667	3590000	3843333	
		Log ₁₀	6,617	6,560	6,551	6,613	6,555	6,585	
		Teste de normalidade de Shapiro-Wilk	W	0,935					
	carboxi-ibuprofeno	Teste de homogeneidade de variância de Bartlett	B	6,771					
		Controlo		0,7	1,4	2,8	5,3	10,6	
		Y _{médio}	3880000	3730000	3186667	3140000	3490000	3130000	
		Log ₁₀	6,589	6,571	6,503	6,495	6,542	6,495	
2-hidroxi-ibuprofeno	Teste de normalidade de Shapiro-Wilk	W	0,974						
	Teste de homogeneidade de variância de Bartlett	B	8,242						
	Controlo		0,5	1,0	2,0	3,9	7,8		
	Y _{médio}	4206667	3623333	3730000	3790000	3640000	3786667		
2-hidroxi-ibuprofeno	Log ₁₀	6,624	6,559	6,572	6,579	6,561	6,578		
	Teste de normalidade de Shapiro-Wilk	W	0,908						
	Teste de homogeneidade de variância de Bartlett	B	2,770						