



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciência

Faculdade de Engenharia

Heleno Cavalcante de Almeida

**Biotecnologia Aplicada à Remoção do Brometo de Etídio por
Ficorremediação**

Rio de Janeiro

2019

Helena Cavalcante de Almeida

Biotecnologia Aplicada à Remoção do Brometo de Etídio por Fitorremediação



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Saneamento Ambiental - Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Orientador: Prof. Dr. André Luís de Sá Salomão

Coorientador: Prof.^a Dr.^a Lia Cardoso Rocha Saraiva Teixeira

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/B

A447 Almeida, Heleno Cavalcante de.
Biotecnologia aplicada à remoção do brometo de etídio por
ficorremediação / Heleno Cavalcante de Almeida. – 2018.
65f.

Orientador: André Luís de Sá Salomão.
Coorientador: Lia Cardoso Rocha Saraiva Teixeira.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Faculdade de Engenharia.

1. Engenharia ambiental - Teses. 2. Água - Purificação -
Tratamento biológico - Teses. 3. Compostos orgânicos - Teses.
4. Algas - Teses. I. Salomão, André Luís de Sá. II. Teixeira, Lia
Cardoso Rocha Saraiva. III. Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Faculdade de Engenharia. IV. Título.

CDU 628.16

Bibliotecária: Júlia Vieira – CRB7/6022

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial
desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Heleno Cavalcante de Almeida

Biotecnologia Aplicada à Remoção do Brometo de Etídio por Fitorremediação

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Saneamento Ambiental - Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Aprovado em ____ de _____ de 2019.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. André Luís de Sá Salomão
Faculdade de Engenharia - UERJ

Prof.^a Dr.^a Lia Cardoso Rocha Saraiva Teixeira
Faculdade de Engenharia - UERJ

Prof.^a Dr.^a Marcia Marques Gomes
Faculdade de Engenharia - UERJ

Dr.^a Maria Egle Cordeiro Setti
Escola Nacional de Saúde Pública - FIOCRUZ.

Dr.^a Andréia da Silva Oliveira
CEO da Empresa iBench

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Dedico a toda a minha família que me apoiou durante o período de formação. Em especial a minha esposa e filha que abdicaram de momentos juntos em função do tempo necessário para a conclusão do mestrado e, principalmente, a Deus por me dar a oportunidade e a capacidade de cursar o mestrado.

AGRADECIMENTO

Ao meu orientador e a minha coorientadora pela dedicação e paciência durante o meu período de lapidação científica. A todos os profissionais do Plataforma/Laboratório de Microscopia Eletrônica e Confocal e Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias (LABIFI) pelo auxílio em todos os momentos durante as minhas pesquisas laboratoriais e a Universidade Estadual do Rio de Janeiro por me oferecer esta formação de forma gratuita.

A todos os professores e colegas de cursos que fizeram parte do meu processo de evolução técnico científica.

Liberté, Égalité, Fraternité
Lema da Revolução Francesa

RESUMO

ALMEIDA, Heleno Cavalcante. *Biotechnologia aplicada à remoção do brometo de etídio por ficorremediação*. 2018. 65f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2019.

Os resíduos químicos gerados por laboratórios de pesquisa e/ou de ensino em universidades e centros de pesquisa, se não forem manuseados adequadamente, geram uma grande preocupação, devido aos riscos ambientais. Alguns resíduos de compostos orgânicos são descartados de forma incorreta quando são provenientes de lavagem de vidraria e limpeza de equipamentos laboratoriais. O brometo de etídio (EtBr) é um composto orgânico amplamente utilizado como um intercalador de DNA em procedimentos de biologia molecular. Este tem a capacidade de intercalar na molécula de DNA, tornando-o uma substância tóxica. Entre as estratégias de tratamento de águas residuais, o uso de microalgas (ficorremediação) tem sido considerado como uma opção potencialmente eficaz para remoção de contaminantes. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito ecotoxicológico do EtBr e a sua remoção em matriz aquosa por três espécies de microalgas unicelulares individualmente (*Chlorella vulgaris*, *Desmodesmus subspicatus* e *Raphidocelis subcapitata*) e em mistura (Mix). A concentração de EtBr que causou efeito em 50% (EC₅₀) da microalga *D. subspicatus* foi 0,375 mg/l e a maior concentração que não causou efeito (NOEC) foi 0,25 mg/L. No primeiro ensaio de tratabilidade de 24h a *R. subcapitata* quando exposta a concentração de 2,0 mg/l de EtBr apresentou uma remoção total (microalgas + fotodegradação) de 34%, sendo 13 % por fotodegradação e 21% pelas microalgas, sendo que 13 % de remoção ocorreu nas primeiras 6 h. No segundo ensaio de tratabilidade não foram observadas grandes variações no número de algas/mL após 3 h de exposição a uma solução 0,5 mg / L de EtBr em água mineral, começando e terminando com 10⁶ algas / mL, com exceção de *R. subcapitata* que terminou com 10⁷ algas / mL. Os resultados em valores absolutos de remoção de EtBr (medidos por fluorescência) após 1 h de tratamento foram: Mix>*D. subspicatus*>*C. vulgaris*>*R. subcapitata*. Após 3 h os melhores resultados em valores absolutos (mg de EtBr) foram: Mix>*D. subspicatus*>*R. subcapitata*>*C. vulgaris*. No entanto, se forem considerados dados relativos de densidade de microalgas (mg/algas/mL), a classificação após uma hora foi: *C. vulgaris*> Mix>*D. subspicatus*>*R. subcapitata*; após 3 h o ranking foi: *D. subspicatus*>*C. vulgaris*> Mix>*R. subcapitata*. Concluiu-se que, apesar do baixo percentual de remoção de EtBr (<11%) obtido com Mix, isso possivelmente esteve relacionado com a baixa densidade de microalgas (10⁶ algas/mL) nos ensaios de tratamento. Com base nesses resultados, foi possível estimar a densidade de cada espécie de microalgas necessária para a remoção total de EtBr, como segue: 10¹⁰ algas/mL para *C. vulgaris*, *D. subspicatus* e Mix; e 10¹¹ algas/mL para *R. subcapitata*.

Palavras-chave: Ficorremediação; Efluente de laboratório; Brometo de Etídio; Biomassa de algas; Densidade de Microalgas.

ABSTRACT

ALMEIDA, Heleno Cavalcante. *Biotechnology applied to removal of ethidium bromide by ficorremediation*. 2018. 65f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2018.

The chemical residues generated by research and/or teaching laboratories at universities and research centers raise a serious concern due to risks posed to the environment if not handled properly. Residues of some organic compound are discarded incorrectly because of inappropriate glass washing and equipment cleaning. Ethidium Bromide (EtBr) is an organic compound widely used as a DNA intercalator in molecular biology procedures and the EtBr ability of intercalating itself in the DNA molecule, makes it a toxic substance. Among biological wastewater treatment strategies, the use of microalgae (phycoremediation) has been appreciated as a potentially effective option to remove target contaminants from water. The objective of this study was to evaluate the ecotoxicological effect of EtBr and its removal in water by three species of unicellular microalgae individually (*Chlorella vulgaris*, *Desmodesmus subspicatus*, and *Raphidocelis subcapitata*) and in a mixture (Mix). EtBr concentration that caused effect in 50% (EC50) of the microalgae *D. subspicatus* was 0.375 mg/L, and the highest concentration that did not cause effect (NOEC) was 0.25 mg/L. In the first treatability assay of 24h, the *R. subcapitata* when exposed to 2.0 mg/L of EtBr removed 34% including photodegradation + microalgae (absorption and degradation), being 13% by photodegradation and 21% by microalgae itself, and 13% of 21% occurred within the first 6 hours. In the second treatability assay, no large variations in the number of algae/mL were observed after 3 hours of exposure to a 0.5 mg/L solution of EtBr in mineral water, starting and ending with 10^6 algae/mL, excepting for *R. subcapitata* that ended with 10^7 algae/mL. The results in absolute values of EtBr removal (measured by fluorescence) after 1 h of treatment were: Mix > *D. subspicatus* > *C. vulgaris* > *R. subcapitata*. After 3 h the best results in absolute values (mg of EtBr) were: Mix > *D. subspicatus* > *R. subcapitata* > *C. vulgaris*. However, if relative microalgae density (mg/algae/mL) data are considered, the ranking after one hour was: *C. vulgaris* > Mix > *D. subspicatus* > *R. subcapitata*; after 3 h the ranking was: *D. subspicatus* > *C. vulgaris* > Mix > *R. subcapitata*. Therefore, it was concluded that, despite the low percentage of EtBr removal (<11%) achieved with Mix, this was due to the low microalgae density 10^6 algae/mL in the treatment assays. Based on these results, it was possible to estimate the density of each microalgae species required for the total EtBr removal as following: 10^{10} algae/mL for *C. vulgaris*, *D. subspicatus* and Mix; and 10^{11} algae/mL for *R. subcapitata*.

Keywords: Phycoremediation; Laboratory effluent; Ethidium bromide; Tertiary effluent treatment; Algal biomass, Microalgae density.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem Três espécies de microalgas verdes utilizadas nos ensaios Espécie de microalga verde: <i>Chlorella vulgaris</i>	30
Figura 2 - Equipamentos utilizados no cultivo e leitura de microalgas	31
Figura 3 - Ensaio estático de ecotoxicidade crônica do Brometo de Etídio (EtBr) com a microalga da espécie <i>D. subspicatus</i> (n=3).....	32
Figura 4 - Câmara de Neubauer utilizada para a contagem de células de microalgas durante os ensaios. (Adaptado de: www.casalab.com).....	34
Figura 5 - Ensaio de remoção de EtBr com a microalga <i>Raphidocelis subcapitata</i> em meio de cultivo	35
Figura 6 - Frasco Erlenmeyer de 2000 mL com a microalga <i>Raphidocelis subcapitata</i> e EtBr durante o ensaio em incubadora	36
Figura 7 - Frascos de Erlenmeyer com as microalgas <i>C. vulgaris</i> e <i>D. subspicatus</i> concentradas após a centrifugação para ser avolumado para 1500ml	38
Figura 8 - Fracos de Erlenmeyer com <i>C. vulgaris</i> e <i>D. subspicatus</i> com aeração durante o ensaio de remoção do EtBr	45
Figura 9 - Filtros com a retenção de microalga para avaliação de biomassa seca ...	46
Figura 10 - Fotografia de microscópio de fluorescência (aumento de 100 63x; emissão $\lambda = 615$ nm e excitação $\lambda = 515$ nm) de microalgas 3h após exposição Brometo de etídio (0,5 mg/L).....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens dos métodos de remoção de micropoluentes citados.....	25
Tabela 2 - Acompanhamento da taxa de crescimento de alga durante as 24 h de exposição e nos intervalos de coleta.....	40
Tabela 3 - Remoção de contaminantes por algas em meio de cultivo em alguns bioensaios	44
Tabela 4 - Remoção de EtBr (total e em intervalos de tempo), densidade de algas -e densidade estimada necessária para o tratamento / remoção de EtBr para cada espécie.....	49
Tabela 5 - Eficiência de remoção de fármacos por algas em diversos tempos de monitoramento	53

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Acompanhamento da densidade de alga a cada tempo de retirada de amostra. Tempo de coleta de amostras, T0 = 0 h; T1= 6 h; T2 = 12 h; T3 = 24 h	40
Gráfico 2 - Valores encontrados de EtBr durante o ensaio na remoção: (extraído pela microalga) pela microalga <i>R. subcapitata</i> , presente meio de cultivo e o fotodegradado	42
Gráfico 3 - Densidade das três espécies de microalgas (algas/mL) durante 3 horas de exposição ao Brometo de Etídio (0,5 mg/L) para avaliação de tratabilidade/remoção.....	47
Gráfico 4 - Remoção percentual entre os períodos.....	48

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	12
1. OBJETIVOS.....	14
1.1. OBJETIVO GERAL.....	14
1.2. OBJETIVO ESPECÍFICO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Exposição ocupacional a agentes químicos	15
2.2. Brometo de Etídio	20
2.3. Presença e remoção de micropoluentes em efluentes.....	22
2.4. Utilização de algas no tratamento de efluentes e remoção de micropoluentes 26	
3. METODOLOGIA.....	29
3.1 Compostos de interesse	29
3.2 Critério de seleção das espécies de microalgas unicelulares.....	29
3.3 Cultivo das algas.....	30
3.4 Ensaio de ecotoxicidade com microalgas unicelulares	31
3.5 Bioensaio de remoção de Brometo de Etídio pela espécie de microalga <i>Raphidocelis subcapitata</i> em meio de cultivo.....	34
3.6 Bioensaio de remoção de EtBr por 3 espécies de microalga em água mineral 37	
4 RESULTADOS E DISCURSÕES	39
4.1 Ensaio de ecotoxicidade com <i>D. subspicatus</i>	39
4.2 Bioensaio de remoção de EtBr com <i>R. subcapitata</i> em meio de cultivo	39
4.3 Remoção de EtBr por 3 espécies de microalga em água mineral	44
5 CONCLUSÃO	54
6 RECOMENDAÇÕES FUTURAS	55
REFERÊNCIAS	56

INTRODUÇÃO

Os resíduos químicos laboratoriais gerados pela pesquisa e/ou atividades de ensino nas universidades e centros de pesquisa são uma preocupação constante, tanto no descarte de resíduos químicos (líquidos e sólidos) como nas águas residuais resultantes da lavagem e limpeza de equipamentos contendo resíduos de compostos químicos (CHAPOT et al., 2009; DA FONSECA, 2006). O impacto ambiental devido ao descarte desses efluentes líquidos de laboratório pode ser relevante, pois algumas substâncias podem ser perigosas (CHAPOT et al., 2009). Esses efluentes ainda podem conter efeitos tóxicos, mutagênicos, carcinogênicos, teratogênicos e / ou desreguladores endócrinos nos seres vivos.

O brometo de etídio (EtBr, $C_{21}H_{2}OBrN_3$) é um composto orgânico amplamente utilizado como um intercalador de DNA em técnicas de biologia molecular, como eletroforese em gel de agarose para a visualização de fragmentos de DNA (LEPECQ; PAOLETTI, 1967; SAYAS; GARCÍA-LÓPEZ; SERRANO, 2015a; WARING, 1965). A capacidade de se intercalar na molécula de DNA faz com que seja um produto altamente tóxico e perigoso, sendo suspeito de causar anomalias genéticas devido aos efeitos mutagênicos das células germinativas (SDS BIO-RAD, 2015). EtBr também pode ser usado em inúmeras outras técnicas e em estudos de microscopia de fluorescência. Os procedimentos em instituições de pesquisa e ensino deve determinar que qualquer resíduo sólido e resíduo líquido gerado após o uso de EtBr precisam seguir o Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviço de Saúde (ANVISA, 2018), na questões de separação, acondicionamento e identificação. No entanto, ainda há o problema do descarte durante a lavagem e a limpeza de material de vidro e equipamentos com resíduos de EtBr. Em alguns casos, o EtBr é quimicamente desativado no recipiente antes da lavagem (DA FONSECA, 2006).

A fitorremediação é definida como o uso de algas para remoção e/ou biotransformação de substâncias tóxicas em água e em ambientes contaminados, (HANUMANTHA RAO et al., 2011). Algumas espécies de microalgas verdes unicelulares, como *Chlorella vulgaris*, *Desmodesmus subspicatus* e *Raphidocelis subcapitata*, têm sido utilizadas (isoladamente ou em conjunto) em estudos de toxicidade, remoção e biodegradação de fármacos e outros compostos químicos e até mesmo no tratamento de efluentes (DANESHVAR et al., 2018; JI et al., 2018; LIU

et al., 2018; MAES et al., 2014; SALOMÃO et al., 2014; SHEN; GAO; LI, 2017). O tratamento de efluentes por processo de ficorremediação está atraindo interesse por ser uma tecnologia de baixo custo (operacional e infraestrutura) e possuir alta capacidade de remoção de nutrientes e altas taxas de produção de biomassa (DANESHVAR et al., 2018). Outra vantagem associada ao uso de microalgas no tratamento de águas residuárias é a capacidade dessas microalgas crescerem junto com outros microrganismos, como bactérias, tornando o tratamento mais eficiente na remoção e biotransformação de compostos orgânicos e outros compostos químicos (JI et al., 2018; SHEN; GAO; LI, 2017).

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral foi avaliar três espécies de microalgas unicelulares, normalmente utilizadas em ensaios de ecotoxicidade, quanto à eficiência na remoção do Brometo de Etídio e produção de biomassa.

1.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- Determinar os efeitos tóxicos do Brometo de Etídio sobre a espécie de microalga *Desmodesmus subspicatus*.
- Avaliar o potencial de remoção do Brometo de Etídio em dois diferentes meios de cultivo (meio Oligo e em água mineral).
- Avaliar o potencial de remoção do Brometo de Etídio em água mineral por cada uma das três espécies de microalgas e pela mistura delas (1:1:1).
- Avaliar o potencial de produção de biomassa em água mineral por cada uma das três espécies de microalgas e pela mistura delas (1:1:1).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Exposição ocupacional a agentes químicos

2.1.1. Órgãos fiscalizadores (nacionais e internacionais)

O Poder Executivo é responsável pelas inspeções de Segurança e Saúde no Trabalho (SST) no Brasil, o órgão federal que realiza a execução é o Ministério da Economia (ME), até dezembro de 2018 esta responsabilidade recaía sobre o extinto Ministério do Trabalho e Emprego (MTE). O ME atua regionalmente nos Estados para realizar as fiscalizações em matéria SST, através da Secretaria de Inspeção do Trabalho.

A Legislação Brasileira relacionada com a Segurança e Saúde do Trabalho foi estabelecida em 1943 com a Consolidação das Leis Trabalhistas (BRASIL - CASA CIVIL, 1943). Os Artigos 154 a 223 do Capítulo V tratam sobre o assunto Higiene e Segurança no Trabalho. O antigo Ministério de Estado do Trabalho, atual Ministério da Economia, através da Lei nº 6514/1977 (PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, 2019), recebeu a atribuição Legal para formular a legislação de Segurança e Saúde. Em 1978, esta Legislação foi aprovada, dando origem as Normas Regulamentadoras (NR).

As NR foram responsáveis por ampliar o texto da CLT através da Portaria nº 3214 de 1978. Com a criação das Normas Regulamentadoras vários agentes químicos passaram a ter limites de exposição estabelecidos. Estes limites foram alinhados com os valores recomendados pela ACGIH (Conferência Americana de Higienistas Industriais Governamentais- American Conference of Governmental Industrial Hygienists) do ano de 1977 (CAMISASSA, 2015). Todavia, até o presente momento, a Legislação Brasileira dentro da relação de agentes químicos nos Anexos 11 e 13 da Norma Regulamentadora nº 15 (BRASIL-MINISTÉRIO DA ECONOMIA - NR Nº15, 1978), não inclui o Brometo de Etídio (EtBr) e conseqüentemente não atribui limite de exposição, mesmo este sendo considerado de alta periculosidade e com potencial carcinogênico (SDS BIO-RAD, 2018).

O Brasil é signatário da OIT (Organização Internacional do Trabalho), porém em sua Convenção nº 170 (ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO TRABALHO, 1990), que estipula a Segurança no Trabalho com Produtos Químicos, também não menciona, nem determina limites seguros de exposição para o Brometo de Etídio. O Brasil também não determina o limite para a exposição ao EtBr, assim como não atribui que a simples presença do EtBr seja determinado medidas de controle ou ações compensatórias de forma financeira.

Nos Estados Unidos foi estabelecido em 1970 o Ato de Segurança e Saúde Ocupacional(LABOR, 1970), que criou a Administração de Segurança e Saúde Ocupacional (OSHA). Este órgão do governo é responsável por regular e fiscalizar as condições de segurança e saúde na maioria das indústrias privadas estaduais ou aprovar planos para que os Estados exerçam esta função. Para o desenvolvimento de pesquisa na área de segurança e saúde de trabalhador e capacitá-lo foi criando em 1970 Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional(NIOSH - NationalInstitute for OccupationalSafetyand Health), todos estes órgãos estão sobre a gestão do Departamento do Trabalho dos Estados Unidos(LABOR, 1970).

Na União Europeia(UE), o artigo 153 do Tratado sobre o Funcionamento da União Europeia(versão consolidada) de, 2016 determina que através de diretivas sejam adotadas ações de Segurança e Saúde Ocupacional em seus Estados membros A diretiva é um ato jurídico que obriga os países membros realizem a transposição do texto para dentro de suas legislações em prazo estabelecido(Agencia Europeia para a Segurança e Saúde no Trabalho,2019). Em 1989, a diretiva 89/391/CEE definida com Diretiva do Conselho, passou a incluir os princípios gerais para prevenção de riscos profissionais e a proteção da segurança e saúde. Esta Diretiva norteou a criação das demais diretivas mais específicas para diversos tópicos como: individual; exposição; exposição a perigos físicos; exposição a agentes biológicos; disposições relativas aos riscos inerentes à carga de trabalho, aos riscos ergonômicos e aos riscos psicossociais; disposições específicas do setor e relacionadas com os trabalhadores(EU-OSHA, 2019).

2.1.2. Principais vias de exposição a compostos químicos em laboratórios

O trabalho em laboratórios pode implicar na exposição a diversas substâncias químicas. As principais vias de exposição são através da: inalação, contato com a pele e com os olhos, ingestão e por injeção (CONCIL, 2011; NIOSH, 2014; OSHA, 2011). A entrada dos agentes químicos por inalação no corpo humano ocorre principalmente por gases, vapor de líquidos voláteis, névoas, aspensão, ou na forma sólida através de partículas, fibras e poeiras (CONCIL, 2011; NIOSH, 2014; OSHA, 2011).

O contato com a pele ocorre principalmente ou com maior intensidade quando atingem os folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas, cortes ou abrasão da camada externa. O contato e a contaminação por absorção pela pele depende da concentração da substância, da solubilidade em gordura (lipossolubilidade) ou água (hidrossolubilidade) (CONCIL, 2011; NIOSH, 2014; OSHA, 2011). A área da pele exposta e o tempo de exposição influenciam na quantidade de substância absorvida pelo indivíduo (CONCIL, 2011; NIOSH, 2014; OSHA, 2011).

Já o contato com os olhos, devido a característica do tecido, pode facilmente causar irritação, o que pode evoluir para uma queimadura e até a perda de visão temporária ou permanente. Os olhos também representam uma forma de entrada rápida no corpo devido a sua vasta vascularização (CONCIL, 2011; NIOSH, 2014; OSHA, 2011).

A ingestão de substâncias químicas acontece pelo contato de contaminantes em alimentos, ou pelo contato de partes do corpo com a boca. A entrada via injeção normalmente acontece através de acidentes em laboratórios, como na quebra de vidraria e perfuração de pele, ou por objetos pontiagudos contaminados (CONCIL, 2011; NIOSH, 2014; OSHA, 2011).

2.1.3. Prevenção de riscos à exposição aos agentes químicos e medidas compensatórias

A legislação brasileira apresenta uma Norma Regulamentadora (NR) que estabelece o Programa de Prevenção de Riscos Ambientais (PPRA), cujo um dos

objetivos é a proteção coletiva do trabalhador (BRASIL-MINISTÉRIO DA ECONOMIA - NR N°9, 1978). A norma determina que deverão ser adotadas medidas para eliminar, minimizar ou controlar os riscos ambientais sempre que forem identificados riscos potenciais ou evidentes à saúde do trabalhador. A NR n°15 estabelece valores limites para a exposição para agentes químicos (Anexo 11, 12 e 13A) e físicos (Anexo 1, 2, 3, 5, 6 e 8) que serão avaliados de forma quantitativa ou de forma qualitativa para agentes biológicos (Anexo 14), para determinados agentes químicos (Anexo 13) e físico (Anexo 7, 9 e 10) . Na ausência de limites nesta norma, devem ser seguidos os limites de exposição da American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) ou parâmetros estabelecidos em negociação coletiva, desde que os critérios técnicos sejam mais restritivos (BRASIL-MINISTÉRIO DA ECONOMIA - NR N°9, 1978). Ao se identificar os agentes químicos, físicos e biológicos que possam causar risco a saúde do trabalhador, devem ser tomadas medidas de proteção coletiva obedecendo a seguinte hierarquia: eliminação, redução da utilização ou não permitir a formação do agente. Caso não for seja possível deve-se prevenir a liberação ou disseminação no ambiente de trabalho. Como última ação de proteção coletiva, devem-se adotar medidas para a redução dos níveis ou concentrações presentes no ambiente, não permitindo que o agente esteja presente no ambiente. Se caso o agente estiver presente,devem ser adotadas medidas para que esta exposição seja atenuada e não afete o trabalhador a ponto de causar doenças ou acidentes(BRASIL-MINISTÉRIO DA ECONOMIA - NR N°9, 1978). Caso as ações para proteção coletivas não sejam suficientes, medidas administrativas são recomendadas, como: (1) treinamento, revezamento de tarefas para permanecer o menor tempo exposto;(2) organização do trabalho para redução da exposição; e(3) o uso de proteção individual (BRASIL-MINISTÉRIO DA ECONOMIA - NR N°9, 1978).

Até que se chegue ao ponto de onde os riscos já são identificados e quantificados, se faz necessário conhecer os riscos potenciais ou seja futurosriscos e os riscos presentes. Estes riscos são identificados através das avaliações qualitativas em projetos de novas instalações; métodos ou processo de trabalho; ou modificação de processos de trabalhos. Para o reconhecimento dos riscos são necessárias as seguintes etapas: (1)identificar qual tipo de agente(químicos, físico ou biológico); (2) a fonte geradora; (3) as possíveis trajetórias e meio de

propagação; (4) a quantidade de pessoas expostas, ou possivelmente expostos; (5) qual tipo de atividade vai ser realizada no local de trabalho e o tempo de duração; (6) o histórico de doenças já identificadas pela exposição aos agentes na literatura ou na empresa; e (7) as medidas e controle já existente. Todas estas etapas são realizadas através de análise qualitativa e quantitativa dos dados existentes da literatura ou da própria empresa.

Quando for inviável tecnicamente a adoção de medidas de proteção coletiva e as medidas de caráter administrativos não forem suficientes, devem ser adotados os usados Equipamentos de Proteção Individual – EPI (BRASIL-MINISTÉRIO DA ECONOMIA - NR N°9, 1978).

Quando o agente físico ou químico for identificado de forma quantitativa, o empregador deverá tomar ações sempre que o valor medido for superior a cinquenta por cento do limite estabelecido na legislação (BRASIL-MINISTÉRIO DA ECONOMIA - NR N°15, 1978). Para os agentes biológicos as avaliações são qualitativas, ou seja, se houver a possibilidade da presença no ambiente, as medidas de controle deverão ser realizadas. (BRASIL-MINISTÉRIO DA ECONOMIA - NR N°9, 1978).

No Brasil, quando uma substância não pode ser atenuada abaixo dos limites de exposição recomendados na Norma Regulamentadora nº 15, o trabalhador em regime da Consolidação das Leis Trabalhistas (BRASIL - CASA CIVIL, 1943) deverá receber um adicional sobre o salário mínimo regional. Este adicional pode variar de acordo com grau de insalubridade da substância indicado na NR 15, sendo mínimo (10% do salário mínimo), médio (20% do salário mínimo) ou máximo (40% do salário mínimo) (BRASIL-MINISTÉRIO DA ECONOMIA - NR N°15, 1978). Terá também o direito a aposentadoria especial se o agente estiver enquadrado como nocivo para a saúde (PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA - CASA CIVIL, 2013).

O EtBr não se encontra na relação do decreto que regulamenta a Previdência Social no Brasil, e também não é listado na Norma Regulamentadora NR15 (BRASIL-MINISTÉRIO DA ECONOMIA - NR N°15, 1978; SOCIAL, 1999). Mesmo não estando na legislação brasileira o limite para a exposição ao EtBr é recomendada a proteção do trabalhador. O fabricante do EtBr recomenda a utilização de óculos de segurança com proteção lateral, uso de luva de segurança

de borracha de nitrila com espessura maior que 0,11 mm para o tempo de exposição de 8 horas. A exposição respiratória, quando o EtBr estiverem em forma de poeira, deve ser realizada o de respirador com filtro P3 - filtra pelo menos 99,95% das partículas em suspensão (ROTH, 2015).

2.2. Brometo de Etídio

O Brometo de Etídio (EtBr) é um composto orgânico aromático ($C_{21}H_{20}BrN_3$), que se apresenta na forma física de cristal vermelho escuro, com massa molecular de 394,4 g, solubilidade em água de 5g/100ml, não radioativo, não volátil e é utilizado como corante em laboratórios de biologia molecular (NCBI, 2019). Este tem a capacidade de intercalar entre as bases nitrogenadas em comisso, afetar muitas funções da célula, como a síntese do DNA e RNA (YURIKO OUCHI, 2011). Também pode ser utilizado em laboratórios de farmacologia para criar modelos de desmielinização da medula espinhal de ratos e camundongos (SALEM et al., 2016).

O EtBr é um corante com característica de fluorescência, sendo que, após a intercalação em cadeia dupla de ácidos nucléico, pode aumentar em mais de 20 vezes sua fluorescência (LEPECQ; PAOLETTI, 1967; SAYAS; GARCÍA-LÓPEZ; SERRANO, 2015b; WARING, 1965). O EtBr é um composto possivelmente estável no ambiente (SAEIDNIA; ABDOLLAHI, 2013) e suspeito de ser persistente no meio ambiente (Agência Europeia de Produtos Químicos – European Chemicals Agency – ECHA, 2018). Por esses motivos deve ser tratado antes do descarte em aterros sanitários, efluentes municipais e principalmente no ambiente (YURIKO OUCHI, 2011).

Uma das formas de comercialização do Brometo de Etídio (EtBr) é na forma de pó. Neste caso, quando inalado, este poderá causar irritação no sistema respiratório, arritmias cardíacas, dores de cabeça, dispneia e queda de pressão arterial (FISPQ – CarlRoth, 2015). As Nações Unidas têm um Sistema Globalmente Harmonizado de classificação e rotulagem de produtos químicos que identifica o EtBr como uma substância que apresenta toxicidade aguda via oral e respiratória e que causa mutagenicidade para células germinativas. O uso de Capelas de Segurança é fundamental para a proteção coletiva e de quem vai manipular o EtBr em pó (ROTH, 2015).

Outra forma comum de comercialização e manipulação do EtBré a líquida (solução concentrada). Para a prevenção da exposição ao EtBr na forma desolúção deve-se utilizar óculos com proteção lateral e luva de borracha de nitrila com espessura maior que 0,11mm (ROTH, 2015), evitando assim o contato pelas mãos ou pelos olhos.

2.2.1. Corantes similares ao Brometo de Etídio

Atualmente, muitas alternativas comerciais estão sendo utilizadas, visando uma ligação de forma mais eficiente aos ácidos nucléicos de cadeia dupla e apresentando resultados melhores de fluorescência, porém com toxicidade mínima. Alguns desses compostos são: RedSafe, Gelred, SYBR Green I, SYBR Green II e SYBR Gold. Em ensaios para identificar os efeitos do EtBr e de outros compostos (SYBR Green I, SYBR Green II e SYBR Gold) em organismos como a bactéria *Salmonella typhimurium*- SYBR Green I, SYBR Green II e SYBR Gold (KIRSANOV et al., 2010; SINGER; LAWLOR; YUE, 1999) e com a levedura *Saccharomyces cerevisia* e -Gelred e RedSafe (SAYAS; GARCÍA-LÓPEZ; SERRANO, 2015b) constatou-se que oEtBre o SYBR Green I causaram efeitos mutagênico, mas o composto químico SYBR Green I causou menorefeito em relação ao EtBr. Já os compostos químicos SYBR Green II e SYBR Gold, Gel Red e Red Safe não apresentaram efeitos mutagênicos nos ensaios.

Os fabricantes não disponibilizam informações sobre os efeitos ecotoxicológicos destes compostos, assim como de persistência, degradabilidade, potencial bioacumulativo e mobilidade no solo.

Em relação ao SYBR Gold o fabricante MSDS, Life Technologies (TECNOLOGIES, 2014) informa para a ecotoxicidade que não contém substâncias conhecidas como perigosas para o ambiente ou não degradáveis em estação de tratamento de esgoto, e o apresenta como completamente solúvel e não bioacumulativo.

O fabricante do RedSafe (BIOTECHNOLOGY, 2014) informa que é um composto com baixo potencial nocivo para a água, no entanto quando em altas concentrações, ou seja, o composto químico não diluído, pode causar danos e impactos em águas subterrânea, cursos de água ou o sistema de esgoto.

O fabricante Merck(MSDS,2015) para o EtBr não disponibiliza dados sobre os efeitos ecotoxicológicos, de persistência, de degradabilidade, de potencial bioacumulativo e de mobilidade no solo.No entanto, o fabricante CarlRoth (ROTH, 2015) informa que de acordo com o regulamento da União Europeia CE nº 1272/2008 relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, o EtBr não deve ser classificado como perigoso para o ambiente aquático, todavia, o próprio fabricante o classifica como de outros efeitosadversos eligeiramente perigoso para as águas ambientais.

2.3. Presença e remoção de micropoluentes em efluentes

Os micropoluentes ambientais são substâncias ou agentes que estão em concentrações na faixa de $\mu\text{g/L}$ (ppb) e ng/L (ppt) nos diferentes ambientes. A maior parte das estações de tratamento de esgotos (ETE) não está preparada ou foi projetada para realizar a remoção/degradação de muitas classes destas substâncias.

Os micropoluentes ambientais abrangem uma grande variedade de substâncias, que em sua maioria são oriundas de atividades antropogênicas. Algumas classes dos micropoluentes são: produtos farmacêuticos, produtos de cuidado pessoal, hormônios, produtos da indústria química, pesticidas, laboratórios de pesquisa e muitas outras fontes(LUO et al., 2014a; MURRAY; THOMAS; BODOUR, 2010; OROS et al., 2003). Estes compostos muitas vezes são de difícil degradação e são considerados como recorrente devido a constante reintrodução em sistemas aquáticos.

A maior parte dos micropoluentes não apresenta valor limite de lançamento em corpos hídricos e nem valores para orientar o monitoramento (BOLONG et al., 2009), sendo que alguns efeitos em organismos de ambiente aquático, como efeitos de desregulação endócrina e resistência a antibióticos, já podem ser observados, tanto em curto, quanto em longos períodos(BOLONG et al., 2009; LAPWORTH et al., 2015; PETRIE; BARDEN; KASPRZYK-HORDERN, 2014; SANTOS et al., 2010; STUART et al., 2012).

A mistura destes compostos em corpos hídricos podem causar efeitos muito maiores do que vem sendo relatado em estudos com compostos individuais, devido aos seus efeitos sinérgicos, aditivos e antagônicos(LUO et al., 2014a; SALOMÃO et al., 2014), afetando assim uma grande diversidade de espécies ao longo do tempo(STAMM et al., 2015).

2.3.1 Principais formas de remoção de micropoluentes

Carvão ativado: é utilizado para remoção de uma larga faixa de micropoluentes, principalmente os hidrofóbicos (ALTMANN et al., 2014). Alguns mecanismos de adsorção e sorção dos micropoluentes em carvão ativado ainda não foram totalmente estudados, porém existem alguns cálculos de superfície e densidade de massa para determinar a eficiência de remoção do carvão ativado. Os mecanismos de remoção de poluentes em águas residuais com a utilização de carvão ativado não foram tão bem estudados como em águas potáveis ou superficiais. Os estudos para águas residuais são mais recentes e a diferença de concentração e o tipo de micropoluentes de uma região para outra e de um tipo de tratamento influenciam diretamente nas concentrações finais do efluente dos sistemas de tratamento que utilizam o carvão ativado (MAILLER et al., 2016).

Coagulação e Flotação: o processo de remoção por coagulação e flotação é capaz de remover um percentual de 20 a 50% de micropoluentes provenientes de fármacos, como diclofenaco, naproxeno e ibuprofeno(SUAREZ; LEMA; OMIL, 2009a). De acordo com a literatura, o cloreto de férrico e o sulfato de alumínio são capazes de remover alguns compostos farmacêuticos hidrofóbicos(HUERTA-FONTELA; GALCERAN; VENTURA, 2011; SUAREZ; LEMA; OMIL, 2009b). No entanto, o tipo de efluente pode influenciar negativamente ou positivamente na capacidade de remoção do micropolvente pela coagulação e flotação (SUAREZ; LEMA; OMIL, 2009b). Alguns fatores que podem variar, como pH, temperatura, alcalinidade, influenciam na capacidade resposta de remoção dos sistemas com coagulação e flotação(LUO et al., 2014a).

Ozonização e processos avançados de oxidação: a oxidação é um processo que tem apresentado altas taxas de degradação de diversos compostos,

além do efeito desinfetante, o que possibilita a utilização da água para reuso em algumas aplicações (HERNÁNDEZ-LEAL et al., 2011). Alguns poluentes como cabamazepina, diclofenaco, indmetacina, sulpirida, trimetoprim, os hormônios esteroides, os produtos de higiene pessoal e entre outras classes de fármacos têm taxa de degradação superior a 90%. No entanto, para alguns retardantes de chama, como TCEP e TCPP (organofosforado), a taxa de degradação não passa de 26% (LUO et al., 2014a). Os processos que envolvem radiação UV são capazes de degradar em média 46% das concentrações iniciais de micropoluentes como fármacos, inibidores de corrosão, biocidas e pesticidas. No entanto, para alguns compostos como o diclofenaco, o cetoprofeno, ácido mefenâmico e o diuron a degradação é superior a 99% (KIM; YAMASHITA; TANAKA, 2009; LUO et al., 2014a). Os processos de oxidação podem gerar alguns subprodutos de baixa concentração e pouca atividade estrogênica ou antimicrobiana. Todavia, para reduzir estes subprodutos é necessária a utilização de filtração biológica ou com carvão ativado como etapa posterior (HOLLENDER et al., 2009; REUNGOAT et al., 2010).

Processo por membranas: O processo de tratamento com a utilização de membranas ocorrer de algumas maneiras, são elas: (1) exclusão - a partícula não passa pela membrana devido ao seu tamanho maior que os poros da membrana; (2) repulsão de carga - quando o soluto (micropolvente) apresenta carga diferente da membrana carregada, há a repulsão deste micropolvente; (3) adsorção - o micropolvente adere na camada externa da membrana e fica retido; (4) interação soluto-soluto - ocorre quando dois solutos se juntam e aumentam de tamanho e assim ficam retidos devido ao tamanho dos poros e por interação de camadas de incrustação. O acúmulo de soluto na membrana impede a passagem pela membrana. A Osmose Reversa tem resultados superiores em relação a ultrafiltração devido a característica da sua estrutura com uma passagem menor para os poluentes. A Osmose Reversa e a Nanofiltração têm alta eficiência de remoção de poluentes e por isso são bastante utilizadas no reuso de água em indústria, mas ainda podem ser permeáveis para poluentes relativamente pequenos (LUO et al., 2014b; PACHECO et al., 2015).

Todo o processo de tratamento por remoção pode apresentar vantagem e desvantagem, o que vai depender do poluente alvo que se deseja tratar. A tabela 1

reuniu as vantagens e desvantagens dos processos de remoção listados neste estudo.

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens dos métodos de remoção de micropoluentes citados

Formas de Remoção	Vantagens	Desvantagens	Autores
Carvão Ativado	Alta remoções da maioria dos fármacos, metabolitos e produtos químicos industriais.	Perda de eficiência quando há aumento de carbono orgânico dissolvido	(BOEHLER et al., 2012; BOLONG et al., 2009; KOVALOVA et al., 2012; WESTERHOFF et al., 2005)
Coagulação/ Floculação	Boa remoção de alguns fármacos, e Nonylphenol. Com ácido húmico dissolvido remove diclofenaco, ibuprofeno e bezafibrato.	Ineficiência na remoção da maioria dos micropoluentes	(ALEXANDER; HAI; AL-ABOUD, 2012; MATAMOROS; SALVADÓ, 2013; SUAREZ; LEMA; OMIL, 2009a)
Ozonização	Transformação de uma ampla gama de micropoluentes em compostos de menor toxicidade e pode ser utilizada em grande escala em plantas de tratamento de águas residuais.	Não oxidam fosfato de tris (2-cloroetil) e tris (1-cloro-2-propil) fosfato.	(ALTMANN et al., 2014; HERNÁNDEZ-LEAL et al., 2011)
Processos por membranas	- Boa capacidade de remoção quando associado a Nanofiltração com Osmose Reversa.	- Baixa capacidade de remoção na microfiltração e ultrafiltração.	(JERMANN et al., 2009; LUO et al., 2014b; PACHECO et al., 2015; SAHAR et al., 2011; YANGALI-QUINTANILLA et al., 2011)

2.4. Utilização de algas no tratamento de efluentes e remoção de micropoluentes

Na remoção de micropoluentes com a utilização de microalgas ocorrem por processos abióticos e bióticos. Os processos abióticos são por sorção, volatilização e fotodegradação. Já os processos bióticos incluem a biodegradação, absorção e metabolização (MATAMOROS et al., 2015).

Estudos com microalgas visam com maior frequência a remoção de matéria orgânica e nutrientes, poucas pesquisas avaliam a capacidade de remoções de micropoluentes (MATAMOROS et al., 2016). Segundo Matamoros *et al.* (2015), a utilização de algas e microalgas em sistemas piloto de tratamento de esgoto por lagoas pode remover até 90 % da concentração de micropoluentes. No entanto, para uma maior eficiência das microalgas no tratamento de efluentes, com altas taxas de remoção dos micropoluentes, é necessário o conhecimento dos fatores físicos (intensidade de luz, temperatura e fatores climáticos), químicos (taxas de CO₂, O₂ e nutrientes) e biológicos (microrganismos patógenos e predadores do fitoplâncton) que influenciam na taxa de crescimento e produção de biomassa (ELUMALAI; SARAVANAN, 2016; MUÑOZ; GUIEYSSE, 2006; PACHECO et al., 2015; SINGH; SINGH, 2015).

Além da temperatura, o comprimento de ondas e a radiação são fatores importantes para o crescimento de algas, seja esta proveniente do Sol ou na forma artificial por lâmpadas (CAI; PARK; LI, 2013; SINGH; SINGH, 2015). O aumento da temperatura e do oxigênio dissolvido reduzem o crescimento das microalgas (SINGH; SINGH, 2015). O fotoperíodo também é um fator importante para o crescimento e o acúmulo de biomassa das algas (SINGH; SINGH, 2015). De maneira geral, as algas verdes têm um melhor crescimento quando expostas a luz, na faixa de cor azul e vermelha, devido ao tipo de clorofila a e b (CAI; PARK; LI, 2013; NORVILL; SHILTON; GUIEYSSE, 2016; SINGH; SINGH, 2015; XIONG; KURADE; JEON, 2018). Todos os fatores citados anteriormente influenciam diretamente no crescimento da biomassa o que afeta na capacidade de remoção dos

micropoluentes pelas microalgas(CAI; PARK; LI, 2013; XIONG; KURADE; JEON, 2018).

O tratamento de águas residuais com a utilização de algas pode ser feito através de fotobiorreatores, biofilmes, lagoas com algas. Estes sistemas são os mais produtivos e apresentam melhores resultado no tratamento (MUÑOZ; GUIEYSSE, 2006; NORVILL; SHILTON; GUIEYSSE, 2016; SINGH; SINGH, 2015). O uso das microalgas para a fitorremediação traz uma série de vantagens para o tratamento, por não gerar poluição secundária ou fazer uso de produtos químicos. As algas utilizadas no tratamento de efluentes podem ser utilizadas na produção de biocombustíveis, fertilizantese sequestrar carbono com um custo reduzido se comparado a outros sistemas que utilizam produtos químicos (MUÑOZ; GUIEYSSE, 2006; PACHECO et al., 2015).

Para sistemas que utilizam culturas em suspensão, como as lagoas com algas para a remoção de poluentes e produção de biomassa, o controle de algumas variáveis são importantes como:tempo de retenção hidráulica, fotoperíodo, profundidade da lagoa, temperatura, pH, quantidade de nutrientes e poluentes que entram no sistema (CRAGGS; SUTHERLAND; CAMPBELL, 2012; CUELLAR-BERMUDEZ et al., 2017). Há variáveis de difícil controle, como a quantidade de luz, que é influenciada pelo fotoperíodo e a radiação solar e irão depender das condições climáticas locais ou serem fornecidas artificialmente, gerando um custo adicional.

O uso de reatores com biofilme de microalga tem uma melhor performance quando utilizados a partir do tratamento secundário para a remoção de nutrientes, turbidez e de poluentes em sistema de tratamento de efluentes municipais e de agricultura. As principais vantagens dos biorreatores com biofilmesão não concorrer com outros organismos e a alta produtividade de biomassa, que pode ser utilizada como fertilizante ou na produção de biocombustíveis(HOH; WATSON; KAN, 2016). A principal desvantagem é o custo de 40% em energia para o cultivo das algas em reatores com biofilme (HU et al., 2008).

Os lagos de algas de alta taxa (high rate algalponds HRAP) são uma alternativa no tratamento com sistemas secundários e terciários, onde junto com a remoção de nutrientes a algas podem remover poluentes e micropoluentes. As

principais vantagens são o baixo consumo de energia, produção de biomassa e biocombustível. Alguns fatores são mais influenciadores quanto a remoção das HRAP como: temperatura, disponibilidade de luz, quantidade de nutrientes, quantidade de carbono necessário para o crescimento das algas, e a faixa de pH ideal para o crescimento das algas (CRAGGS et al., 2014; SUTHERLAND et al., 2015).

O tratamento para a remoção dos diferentes compostos orgânicos com a utilização de algas (fitorremediação) e os efeitos ecotoxicológicos com o uso de microalgas em ensaios de laboratório vêm sendo pesquisado por outros autores, no entanto o presente estudo tem o objetivo de realizar estas avaliações com o composto orgânico Brometo de Etídio (EtBr).

3. METODOLOGIA

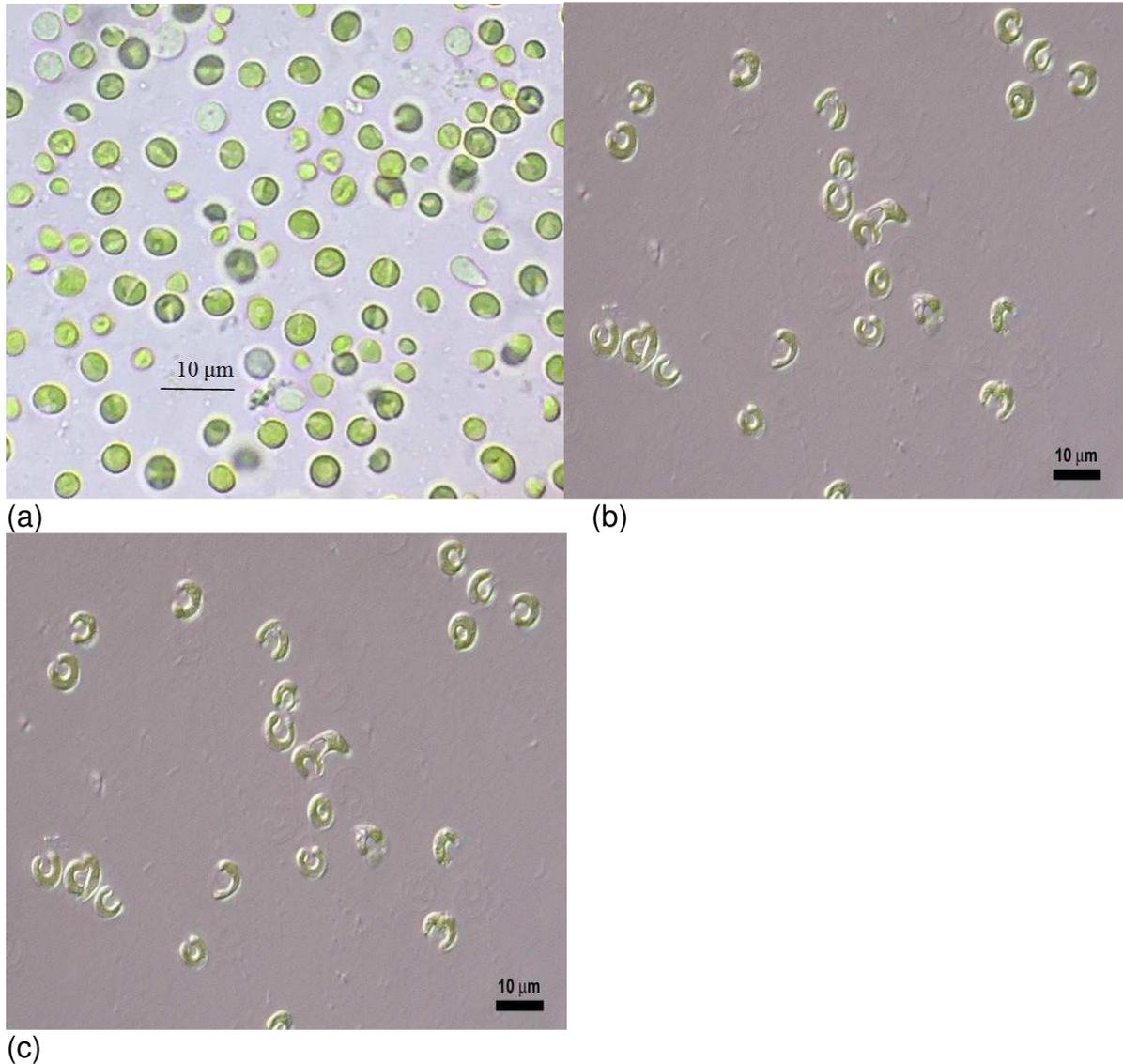
3.1 Compostos de interesse

O Brometo de Etídio, $C_{21}H_{20}BrN_3$ (CAS number 5763-6; Sigma Aldrich), utilizado no presente estudo de tratabilidade foi cedido por uma Instituição de Pesquisa no Estado do Rio de Janeiro. A água ultrapura para uso no ensaio foi obtida no sistema Milli-Q Plus system da Millipore (USA) com $18,2 M \Omega cm$ de resistividade. Água mineral usada para o preparo do meio de cultivo foi da marca BIOLEVE.

3.2 Critério de seleção das espécies de microalgas unicelulares

A seleção das três espécies de microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Desmodesmus subspicatus* e *Raphidocelis subcapitata*) se deu por dois fatores, sendo o primeiro deles a indicação na ABNT NBR 12648 (ABNT NBR 12648, 2018) para ensaios de ecotoxicidade. O segundo fator foi pela alta capacidade de remoção de nutriente e de contaminantes em processos ou unidades de tratamento de águas residuais com efluentes primários e secundários relatados na literatura: *Chlorella vulgaris* (Figura 1) e *R. subcapitata* (Figura 1) (HOH; WATSON; KAN, 2016; MATAMOROS et al., 2015) e *Desmodesmus subspicatus* (Figura 1) (JI et al., 2014; SAMORÌ et al., 2013).

Figura 1 - Três espécies de microalgas fotossintéticas unicelulares utilizadas nos ensaios de ecotoxicidade e tratabilidade para remoção do Brometo de Etídio: (a) *Chlorella vulgaris*; (b) *Desmodesmus subspicatus*; (c) *Raphidocelis subcapitata*



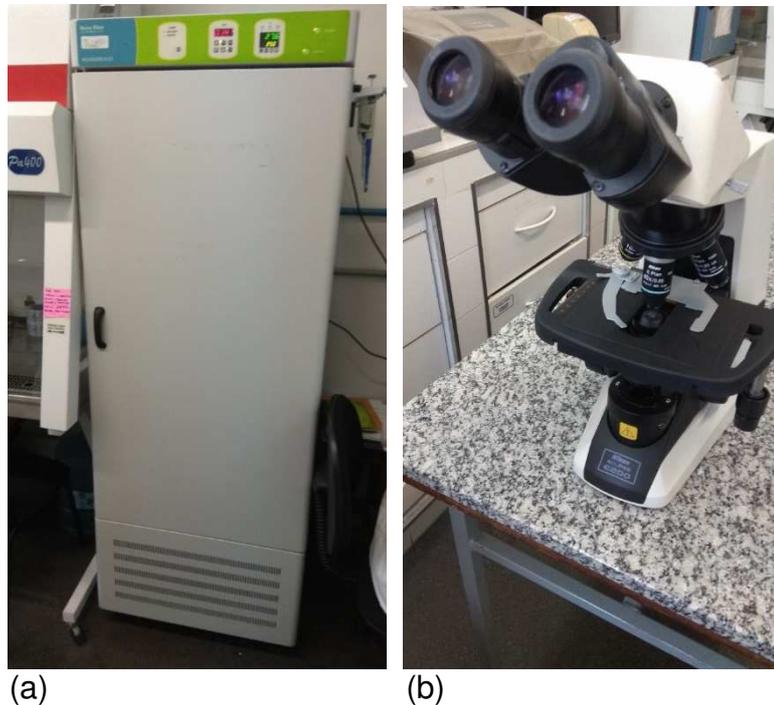
Fonte: *Chlorella vulgaris* (RAMARAJ; DUSSADEE, 2016), *Desmodesmus subspicatus* e *Raphidocelis subcapitata* (CCALA, 2019).

3.3 Cultivo das algas

As microalgas unicelulares fotossintéticas, *Chlorella vulgaris*, *Desmodesmus subspicatus* e *Raphidocelis subcapitata* foram cultivadas e mantidas em incubadoras com fotoperíodo (16:8 luz: escuro) e temperatura controladas (25 °C) (Figura 2 a) de acordo com a Norma ABNT NBR 12648 (ABNT NBR 12648, 2018). As espécies de microalgas foram adquiridas do banco de algas da Universidade de Göttingen, Alemanha (SAG) e do banco de algas da Universidade de Linnaeus, na Suécia.

Os cultivos foram replicados numa frequência mensal. O crescimento e o desenvolvimento dos cultivos foram acompanhados mensalmente por contagem em microscópio (Figura 2 b), medição da clorofila *in vivo* por fluorescência (485 nm de excitação e 685 nm de emissão) para a realização da carta controle (ABNT NBR 12648, 2018).

Figura 2 - Equipamentos utilizados: (a) Incubadora (Nova Ética, modelo B.O.D) utilizada no cultivo; (b) Microscópio Nikon (modelo Elipse E200) utilizado na contagem de células de algas



Fonte: O autor, 2018

3.4 Ensaios de ecotoxicidade com microalgas unicelulares

O ensaio estático de ecotoxicidade para avaliação da toxicidade crônica do Brometo de Etídio foi realizado com a microalga da espécie *D. subspicatus* de acordo com a Norma ABNT NBR 12648 (ABNT NBR 12648, 2018).

O inóculo do ensaio foi preparado de 3-5 dias antes ou até que apresentasse crescimento exponencial. Para isso, uma alíquota dos organismos do cultivo foi inoculada em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL, devidamente lavados e esterilizados, contendo 150 mL de meio L.C. Oligo, preparado conforme

recomendado no Anexo A da NBR:ABNT 12648:2018, e foram mantidos em incubadora com temperatura controlada (25 °C) e luz contínua (4500 lux).

Os ensaios foram realizados em 96h, (ABNT NBR 12648, 2018), com seis concentrações de EtBr(0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; e 8,0 mg/L) e em frasco de Erlenmeyers de 125mL em triplicata (Figura 3), com densidade final de 10^5 algas/ml em meio de cultivo Oligo (Anexo A, ABNT NBR 12648,2018). Dois controles em triplicata foram realizados, sendo um o controle negativo contendo somente a *D. subspicatus* no meio de cultivo, e o outro o controle de fotodegradação contendo somente o EtBr em meio sem a presença da microalga.

Figura 3 - Ensaio estático de ecotoxicidade crônica do Brometo de Etídio (EtBr) com a microalga da espécie *D. subspicatus* (n=3). Da esquerda para a direita: 1ª coluna - Controle EtBr; 2ª coluna - Controle negativo; 3ª-8ª coluna 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 mg/L de EtBr



Fonte: O autor, 2018

Todos os frascos (amostras e controles) foram incubadas por 96 h à 25°C e mantidos em luz constante com agitação manual duas vezes ao dia. Durante o período de exposição foram coletadas amostras de 1 mL de todos os frascos a cada 24 h (T_0 , T_{24} , T_{48} , T_{72} , T_{96}), sendo devolvidos para a incubadora (Nova Ética, modelo B.O.D) em posição aleatória. As amostras foram coletadas em Eppendorfs de 2,5 mL contendo 1,0 mL de amostra e uma gota de solução de lugol para posterior contagem celular em microscópio óptico.

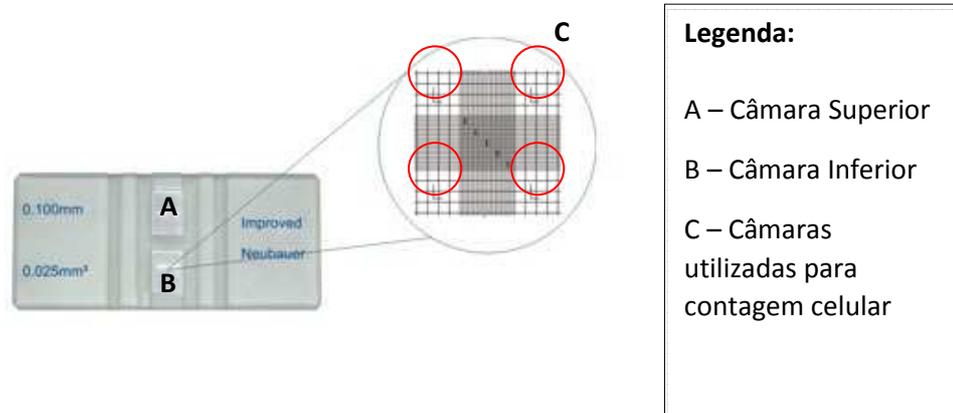
A contagem de células foi realizada em microscópio óptico da marca Nikon (modelo Elipse E200) com 400x aumento, utilizando-se a câmara de Neubauer. Trata-se de uma lâmina de vidro, dividida em 2 câmaras, sendo uma superior (A) e

outra inferior (B), contendo 9 quadrantes em cada (C), cada um deles subdividido em 16 quadrantes de $1/25\text{mm}^2$ (Figura 4).

Foram contabilizadas as células visualizadas nos quadrantes laterais (Figura 4) das câmaras superior e inferior. Para a contagem final do número de células foi realizada com a média desses valores. O número de células obtidas foi multiplicado por 2.500 que corresponde ao número total de quadrantes da lâmina, para se obter o número total de células de microalgas presentes em cada amostra analisada. Desse valor foi subtraído o valor de biomassa algácea inicial, ou seja, inoculada no dia em que o ensaio foi preparado. O valor final foi comparado com os valores obtidos nos ensaios controle, para verificação do efeito crônico de inibição de crescimento de biomassa ao longo das 96 h de ensaio.

Os efeitos crônicos avaliados foram o LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration* – Menor Concentração com Efeito Observado), o NOEC (*No Observed Effect Concentration* – Maior Concentração de Efeito Não Observado) e o EC_{50} (*Half Maximal Effective Concentration in 50%*- Concentração de efeito em 50% dos organismos). Esses efeitos foram verificados aplicando-se análise estatística utilizando o programa ICPIN (versão 5.02) e de acordo com a Norma ABNT – NBRABNT 12648, 2018 para avaliar o crescimento das microalgas no controle negativo e nas seis concentrações avaliadas.

Figura 4 - Câmara de Neubauer utilizada para a contagem de células de microalgas durante os ensaios

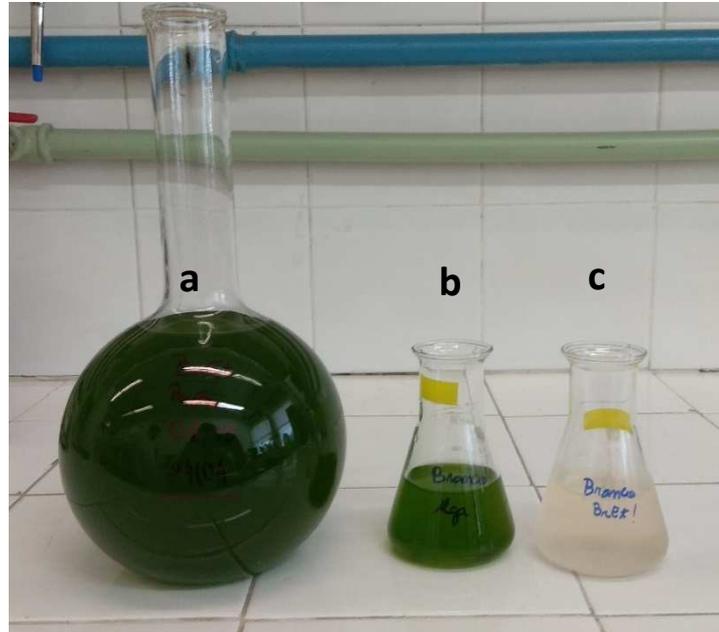


Adaptado de: www.casalab.com

3.5 Bioensaios de remoção de Brometo de Etídio pela espécie de microalga *Raphidocelis subcapitata* em meio de cultivo

Os bioensaios de remoção de EtBr em meio L.C. Oligo com as microalgas unicelulares foram realizados baseados na Norma ABNT NBR 12648 (ABNT NBR 12648, 2018), com a espécie *Raphidocelis subcapitata*. Este método, estático, consistiu na exposição das microalgas ao Brometo de Etídio na concentração de 2 mg/L, durante um período de 24 h. O efeito tóxico foi determinado pela inibição do crescimento da biomassa de alga, comparado com o controle negativo, sob as mesmas condições de ensaio. O pré-cultivo das microalgas foi iniciado de três a cinco dias antes do ensaio, ou até que as microalgas apresentassem crescimento exponencial (Figura 5). A biomassa inicial de microalga no ensaio foi 10^7 células/mL.

Figura 5 - Ensaio de remoção de EtBr com a microalga *Raphidocelis subcapitata* em meio de cultivo. (a) Balão de fundo chato com 1.500 mL de solução de meio de cultivo Oligo e EtBr; (b) Frascos Erlenmeyer 250 ml com o controle de alga; (c) Frasco Erlenmeyer 250 ml com controle de EtBr.



Fonte: O autor, 2018.

O ensaio foi realizado em frascos Erlenmeyer de 2.000 mL (Figura 6) com 1.500 mL de solução de meio de cultivo Oligo e sendo mantido a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h, com aeração e iluminação contínua (lâmpada fluorescente 4.500 lux). As coletas foram realizadas nos intervalos 0; 6; 12; e 24h, para determinação da biomassa de alga, composto livre em água e composto associados com as microalgas (adsorvido e absorvido).

A fotodegradação de EtBr em meio foi avaliada durante o teste e o valor foi descontado no cálculo da remoção de microalgas.

A determinação da biomassa das microalgas foi determinada por contagem celular em um microscópio óptico e em câmara de Neubauer, com a preservação de 1 mL das amostras de algas em solução de lugol.

A determinação do composto livre em água foi realizada com a centrifugação (1.500 rpm por 15 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) de 40 mL da solução de microalgas expostas. Após centrifugação 4 mL do sobrenadante foi coletado para a quantificação do EtBr por fluorescência (emissão $\lambda = 610\text{ nm}$ e excitação $\lambda = 518\text{ nm}$) em um

espectrofotômetro (Modelar Devices, Spectramax M3). A curva de calibração foi realizada na faixa de 0,25 - 8 mg/L EtBr.

A determinação do composto associados com as microalgas (adsorvido e absorvido) foi realizado com o precipitado da centrifugação. Para isso, foram adicionados 5 mL de metanol para a extração dos compostos adsorvidos e absorvidos (lise das células) e agitado por 60 segundos em vórtex e novamente centrifugado em 5.000 rpm por 15 minutos a 4 °C (Eppendorf, modelo 5810R). Após centrifugação foram removidos o sobrenadante e repetido o processo de extração com a adição de mais 5mL de metanol. Ao final o volume de 10 mL foi analisado por espectrofotometria conforme descrito anteriormente para a quantificação do composto.

Figura 6 - Frasco Erlenmeyer de 2000 mL com a microalga *Raphidocelis subcapitata* e EtBr durante o ensaio em incubadora



Fonte: O autor, 2018

3.6 Bioensaios de remoção de EtBr por 3 espécies de microalga em água mineral

Neste estudo foram avaliadas a produção de biomassa e a remoção de EtBr por cada uma das três espécies de alga (*Chlorella vulgaris*, *Desmodesmus subspicatus* e *Raphidocelis subcapitata*) e também em uma mistura (MIX) contendo as três espécies (1: 1: 1) por um período de 3 h. Os bioensaios de remoção de EtBr em água mineral foram realizados baseados na Norma ABNT NBR 12648 (ABNT NBR 12648, 2018). A concentração inicial do EtBr no ensaio de remoção foi 0,5mg/L, sendo esta, a máxima utilizada em testes laboratoriais de microscopia. O pré-cultivo das microalgas foi iniciado de três a cinco dias antes do ensaio, ou até que as microalgas apresentassem crescimento exponencial.

No dia do bioensaio, para evitar a interferência de alguns compostos presentes no meio de cultivo, o inóculo foi centrifugado (5 min, 1500 rpm a 4 °C) e o sobrenadante foi descartado. Após a centrifugação de todo o volume do inóculo do pré-cultivo (Figura 7), as microalgas sedimentadas foram transferidas gentilmente para um Becker de 2000 mL com 1000 mL de água mineral e, em seguida, o avolumado para 1500 mL. A biomassa inicial de microalgas para o bioensaio foi de 10^6 células/mL. Os testes foram realizados sob condições ideais de 25 °C, com luz (4500 lux) e aeração constantes.

A quantificação da produção de biomassa de microalgas e do EtBr em água foi realizada, coletando 466 mL da solução teste, nos seguintes intervalos: 0; 1; 3h (T0, T1 e T2). Sendo: 230 mL para centrifugação; 230 mL para filtração; 5mL para leitura da fluorescência da concentração de BrEt; e 1 mL em Eppendorf com Lugol para contagem em microscópio.

A quantificação da biomassa foi realizada de duas formas: (i) contagem de células em microscópio óptico (câmara de Neubauer), preservando 1 mL das amostras de algas em solução de Lugol; (ii) determinação da biomassa seca de algas, com a filtração de 230 mL em membrana de fibra de vidro de 0,2-0,6 μ m, exceto para a *R. subcapitata* e o MIX apresentaram dificuldade de passar pela membrana e os volumes filtrados variaram de 70 -100 ml.

A quantificação do composto livre em água foi realizada após centrifugação (5000 rpm; 5 min; 4 °C) de 230 mL da microalga e a solução teste de EtBr. Após centrifugação, 6 ml do sobrenadante foram transferidos para um tubo de ensaio e realizada a leitura por fluorescência (emissão $\lambda = 610$ nm e excitação $\lambda = 518$ nm) para a determinação da concentração de EtBr. Uma curva de calibração foi feita na faixa de 0,03 - 0,5 mg/L EtBr. A fotodegradação do EtBr em água mineral foi avaliada durante o teste e o valor foi descontado no cálculo da remoção de microalgas.

A biomassa de microalgas precipitadas, após centrifugação para a determinação do composto livre em água, foi coletada e utilizada na preparação de lâminas para Microscopia de fluorescência. As lâminas foram fotografadas sob microscopia de fluorescência (aumento de 63x; emissão $\lambda = 615$ nm e excitação $\lambda = 515$ nm) para verificar a presença de EtBr nas microalgas (nas membranas, no citoplasma e no núcleo).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o GraphPad Prism (versão 5.02 para Windows, San Diego, EUA).

Figura 7 - Frascos de Erlenmeyer com as microalgas *C. vulgaris* e *D. subspicatus* concentradas após a centrifugação



Fonte: O autor, 2018

4 RESULTADOS E DISCURSÕES

4.1 Bioensaios de ecotoxicidade com *D. subspicatus*

Os resultados do bioensaio crônico com a *D. subspicatus*, após contagem das microalgas e o uso do programa estatístico ICPIN, foram: $EC_{50} = 0,375$ mg/L, $NOEC = 0,25$ mg/L e $LOEC = 0,5$ mg/L. Com isso, a maior concentração que não causou efeito crônico nas microalgas expostas por 96 h foi 0,25 mg/L, sendo esta considerada como não tóxica e aceitável após um tratamento e antes de um lançamento em um corpo hídrico. Já as concentrações $>0,25$ mg/L podem ser consideradas como de efeito crônico, visto que a concentração de 0,375 mg/L foi considerada tóxica para 50 % dos organismos expostos.

Com base nestes parâmetros um novo ensaio foi realizado para definir a capacidade de remoção e a fotodegradação em um período de 24h.

4.2 Bioensaios de remoção de EtBr com *R. subcapitata* em meio de cultivo

No bioensaio de remoção do EtBr em meio de cultivo as microalgas *R. subcapitata* apresentaram crescimento constante durante as 24h de ensaio (Gráfico 1). O controle apresentou crescimento total de aproximadamente 75%, enquanto as algas expostas ao EtBr apresentaram crescimento de aproximadamente 50% (Tabela 2). A maior taxa de crescimento no controle foi verificada nas primeiras 6 horas, e nos outros dois períodos de 12 h e de 24h a taxa de crescimento manteve-se constante em 5% entre período. Um comportamento diferente foi verificado quando as algas foram expostas ao EtBr. Uma taxa menor de crescimento foi observada entre o período inicial e as 6 h (20%) e ela permaneceu nas 12 primeiras horas, caindo para 8 % nas 12 h subsequente.

No ensaio realizado por (MATAMOROS et al., 2016) o crescimento de biomassa de microalgas da espécie *Chlorella sp.* e *Scenedesmus sp* quando expostas a águas de esgoto urbano com Cafeína, Ibuprofeno, Galaxolida, Fosfato de tributilo, 4-octilfenol, tris (2-cloroetil) fosfato e Carbamazepina, apresentaram crescimento constante durante os 10 dias de avaliação e ao final apresentaram uma

taxa superior a 100% de crescimento se comparada a biomassa inicial, sendo essa taxa inferior a 20% nas primeiras 24 h.

Gráfico 1 - Acompanhamento da densidade de alga a cada tempo de retirada de amostra. Tempo de coleta de amostras, T0 = 0 h; T1= 6 h; T2 = 12 h; T3 = 24 h

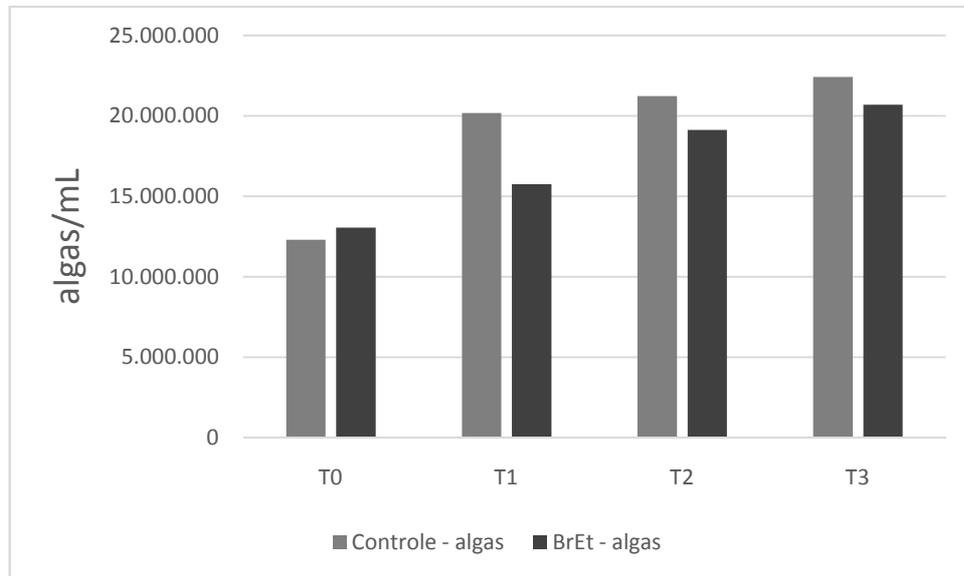


Tabela 2 - Acompanhamento da taxa de crescimento da microalga *R. subcapitata* alga durante as 24 h de exposição e nos intervalos de coleta

Taxa de Crescimento em % entre períodos	T0/T1	T1/T2	T2/T3	Tempo total
Controle de algas	64,0 %	5,2 %	5,7 %	74,9 %
Bioensaio com EtBr	20,7 %	21,4 %	8,2 %	50,4 %

Legenda: T0/T1 – taxa de crescimento entre os intervalos de 0-6 h; T1/T2 entre 6 - 12h e T2/T3 para o intervalo de 12 - 24 h. Tempo total: taxa de crescimento de início ao final do bioensaio, de 0 - 24 h.

A Remoção total do EtBr durante as 24 h de exposição pelas microalgas (bioadsorção e bioabsorção) e pela fotodegradação foi de 34%, sendo que após as 6 primeiras horas foi 19%, nas 6 horas seguintes (ou seja, T2 = 12h) foi 10% e nas últimas 12 h (T3 = 24h) 9%. Nesse mesmo período de 24 h a fotodegradação do

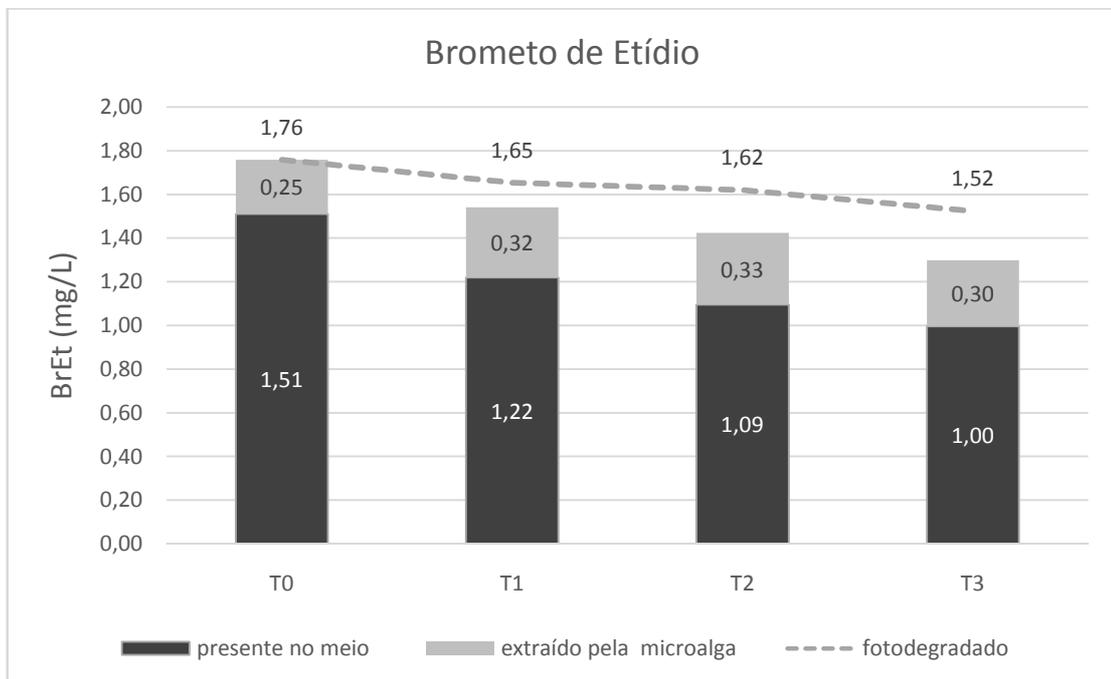
EtBr foi 13% (sendo 6% nas primeiras 6h). Logo, se for descontada a fotodegradação da remoção total de EtBr, em 24 h foram removidos 21% pelas microalgas, sendo que nas 6 primeiras horas foram 13%; 8% nas 6 h seguintes; e 3% na últimas 12 h.

O resultado da extração de EtBr das microalgas sedimentadas na centrifugação para avaliação da bioadsorção e bioabsorção apresentou o mesmo comportamento de uma maior remoção nas primeiras horas de exposição (Gráfico 2). No entanto, esse processo ocorreu em um intervalo curto de poucos minutos, entre a adição do EtBr no meio e a coleta da amostra T0 (0,25 mg/L), sendo esta considerada como de rápida ação (Gráfico2). No entanto, ao longo das 24h de contato a remoção de 0,30 mg/L.

De acordo com SHI et al. (2010) em um ensaio de adsorção com algas desidratadas, após 20 minutos uma mistura contendo várias espécies de microalgas *Anabaena cylindrica*, *Chlorococcus*, *Spirulina platensis*, *Chlorella*, *Scenedesmus quadricauda*, e *Euglena anabaena* foi capaz de adsorver o hormônio sintético 17 α -etinilestradiol (EE2), e os hormônios naturais estrona (E1) e 17 β -estradiol (E2).

Mesmo o presente estudo não sendo um ensaio com microalgas secas, a provável explicação para uma rápida remoção do EtBr pode ser a biosorção, assim como verificado por SHI, 2010 (SHI et al., 2010).

Gráfico 2 - Valores encontrados de EtBr durante o ensaio na remoção: (extraído pela microalga) pela microalga *R. subcapitata*, presente meio de cultivo e o fotodegradado



Legenda: Cinza escuro (Centrifugado) – EtBr presente no meio; Cinza claro (Extraído) – EtBr presente dentro da microalga *R. subcapitata*; Linha tracejada – foto degradação do EtBr em meio sem a microalga. T0 = 0h; T1= 6h; T2=12h; T3=24h.

A absorção dos micropoluentes orgânicos, como o EtBr, pode ocorrer em baixas concentrações juntamente com os nutrientes necessários para a manutenção da vida desses organismos, como forma de obtenção de fontes de carbono (LIU et al., 2018; XIONG; KURADE; JEON, 2017). Segundo a literatura, alguns compostos orgânicos como 17 α -ethinylestradiol, levofloxacin, e carbamazepina podem ser usados como fonte de carbono, necessários para o seu crescimento, e com isso, podem não apresentar efeito de inibição do crescimento, interferindo nos resultados dos ensaios (MAES et al., 2014; XIONG et al., 2017).

Segundo LIU (LIU et al., 2018), a *R. subcapitata* quando exposta a alguns contaminantes orgânicos solúveis em água (ex.: hormônios 17 β -Estradiol e Dietilstilbestrol) foi capaz de remover de forma rápida estes compostos por adsorção e absorção. Segundo COOGAN et al.(2007) alguns outros compostos como Xileno, Benzeno, Tolueno, Etil-Benzeno também podem ser removidos por bioconcentração.

Segundo HOM-DIAZ (HOM-DIAZ et al., 2015a), a espécie de microalga *Selenastrum capricornutum* foi capaz de remover por adsorção 46% de 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol em um período de 7 dias, já a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* foi capaz de remover por adsorção 40% 17 β -estradiol e 41% de 17 α -etinilestradiol no mesmo período.

PENG (PENG et al., 2014) em seu experimento de 120h onde foram avaliadas a biotransformação dos compostos Progesterona e Norgestrel por duas espécies de microalgas (*Scenedesmus obliquus* e *Chlorella pyrenoidosa*) observou-se que as algas que morreram retiraram do meio um pouco menos de 20% dos compostos por adsorção. Ou seja, mesmo não sendo o objetivo da pesquisa a remoção dos dois compostos por adsorção, esta ocorreu devido a capacidade de biosorção das algas. Neste mesmo ensaio foi observado que as microalgas vivas da espécie *Chlorella pyrenoidosa* não foram capazes de biosorver a Progesterona e o Norgestrel, mas a microalga *Scenedesmus obliquus* vivas foram capazes de adsorver e absorver o Norgestrel em pequenas quantidades (PENG et al., 2014).

A microalga *Chlorella vulgaris*, ao ser testada com Levofloxacina durante 11 dias apresentou resultados de remoção por bioacumulação de 11,26% (1,07 mg/L) e bioadsorção de 9,47%. Em relação a remoção total por biodregadação, bioacumulação e biosorção no período, não foi identificada remoção abiótica (XIONG; KURADE; JEON, 2017).

Na Tabela 3 foram representados os valores da literatura para remoção de alguns micropoluentes, principalmente na linha dos fármacos por algumas espécies de microalgas (XIONG; KURADE; JEON, 2018). Os tempos de ensaio para remoção dos contaminantes variaram de 48 h até 336 h, assim como as espécies de algas testadas. Ainda de acordo com a tabela 3, grande parte dos estudos realizaram seus ensaios com tempos superiores a 240 h, alcançando as seguintes eficiências de remoção com a *Chlorella vulgaris*: Levofloxacina (10 – 92 %) (Xiong, et al., 2017). As maiores taxas de remoção de alguns fármacos avaliados foram removidos principalmente em períodos de ensaio superiores a 120h (5 dias) (HOM-DIAZ et al., 2015b; PENG et al., 2014; XIONG; KURADE; JEON, 2017).

Tabela 3 - Remoção de contaminantes por algas em meio de cultivo em alguns bioensaios

Espécies de Alga	Contaminante e eficiência de remoção (%)	Tempo máximo do ensaio(h)	Meios de Cultivo	Referências
Scenedesmus obliquus, Chlorella pyrenoidosa	Progesterone (95), norgestrel (60–100)	120	BG11 medium	Peng, et al., 2014
Desmodesmus subspicatus	17 α -Ethinylestradiol (68)	72	M4 medium	Maes, et al., 2014
Chlamydomonas mexicana, Scenedesmus obliquus	Carbamazepine (30–37)	240	Bold's Basalmedium	Xiong, et al., 2016
Microcystis aeruginosa	Amoxicillin (18–31)	144	BG11 medium	Liu, et al., 2014
Chlorella pyrenoidosa	Cefradine (76)	96	BG11 medium	Chen, et al., 2015
Navicula sp.	Ibuprofen (60)	360	D1 medium	Ding, et al., 2017
Chlorella vulgaris	Levofloxacin (10–92)	264	Bold's basal medium	Xiong, et al., 2017
Chlamydomonas mexicana	Ciprofloxacin (10–56)	264	Bold's basal medium	Xiong, et al., 2017
Selenastrumcapricornutum	Estradiol (88–100), 17 α -ethinylestradiol (60–95)	240	growthmedium	Hom-Diaz, et al., 2015
Chlamydomonas reinhardtii	Estradiol (100), 17 α -ethinylestradiol (100)	240	growthmedium	Hom-Diaz, et al., 2015
Nannochloris sp.	Trimethoprim (0), sulfamethoxazole (32), triclosan (100)	336	F/2 algalculturemedium	X. Bai, K. Acharya, 2016
Chlorella pyrenoidosa	Amoxicillin (77), cefradine (23)	48	BG11 medium	Li, et al., 2015

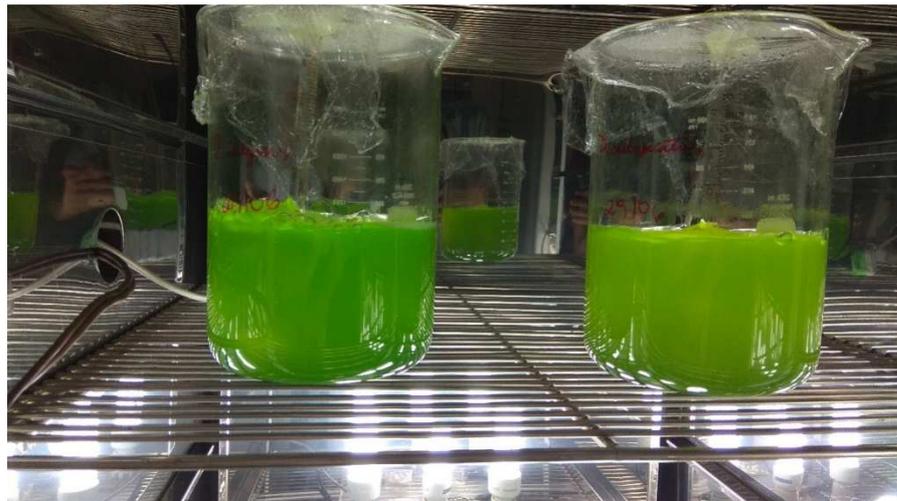
Fonte:Modificada de Xiong, 2017, pelo autor

4.3 Remoção de EtBr por 3 espécies de microalga em água mineral

Ao realizar o ensaio com meio de cultivo em 24 h (Figura 8), constatou-se que em um curto espaço de tempo (minutos) de exposição a microalga *Raphidocelis subcapitata* foi capaz de remover mais de 83% do total removido de EtBr em 24h. Esta capacidade foi constatada no tempo que chamado de zero hora, pois poucos minutos se passaram desde a colocação do EtBr e o início da leitura da concentração do EtBr na microalga (adsorvido e absorvido). O resultado foi análogo ao encontrado na remoção de 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol com a cultura de 6 diferentes tipos de algas *Anabaena cylindrica*, *Chlorococcus*, *Spirulina platensis*, *Chlorella*, *Scenedesmus quadricauda* e *Anabaena sp* onde uma rápida remoção ocorreu nos primeiros 20 minutos, assim como na remoção de antibiótico ceftazidima, com a microalga *Chlorella pyrenoidosa* que a partir de 4h de ensaio praticamente não ocorreu mais remoção do antibiótico até 6h (SHI et al., 2010; YU et al., 2017).

A capacidade de bioacumulação de um composto pretendido pela alga poderá influenciar diretamente em uma maior ou menor necessidade de tempo de retenção hidráulica para que ocorra o processo de remoção e ou biotransformação. O tempo de retenção hidráulica de um projeto vai influenciar também no volume de efluente tratado por dia, podendo tornar um projeto mais ou menos viável. Segundo a literatura, o tempo de retenção hidráulico no tratamento com algas é uma das desvantagens dos sistemas para alguns poluentes (ACIÉN et al., 2016; DE-BASHAN; BASHAN, 2010; NORVILL; SHILTON; GUIEYSSE, 2016). Para que a bioacumulação seja rápida o número de algas presente no meio de tratamento (densidade) vai influenciar positivamente na remoção (BEN CHEKROUN; SÁNCHEZ; BAGHOUR, 2014).

Figura 8 - Frascos de Erlenmeyer com *C. vulgaris* e *D subspicatus* com aeração durante o ensaio de remoção do EtBr

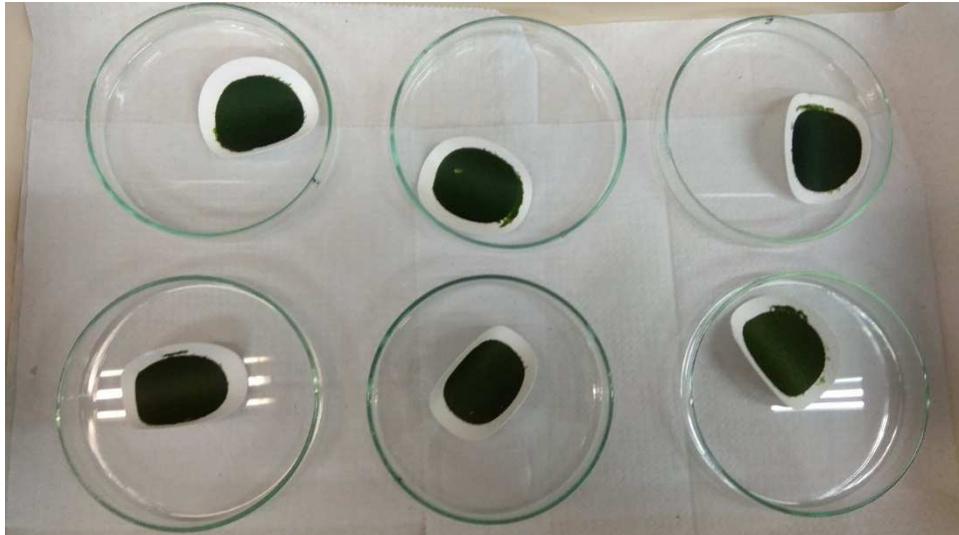


Fonte: O autor, 2018

4.3.1 Produção de biomassa de microalgas

Mesmo sabendo que o tempo de exposição de três horas não seria suficiente para avaliar o potencial de crescimento das três espécies de microalgas selecionadas, foram realizadas filtração para avaliação da biomassa seca (Figura 9) e contagens do número de microalgas/mL para avaliar o efeito tóxico potencial do EtBr. O efeito tóxico foi investigado, pois caso fosse verificado efeito tóxico, este poderia impedir o tratamento/remoção de EtBr em períodos superiores a 24 h.

Figura 9 - Filtros com a retenção de microalga para avaliação de biomassa seca



Fonte: O autor, 2018

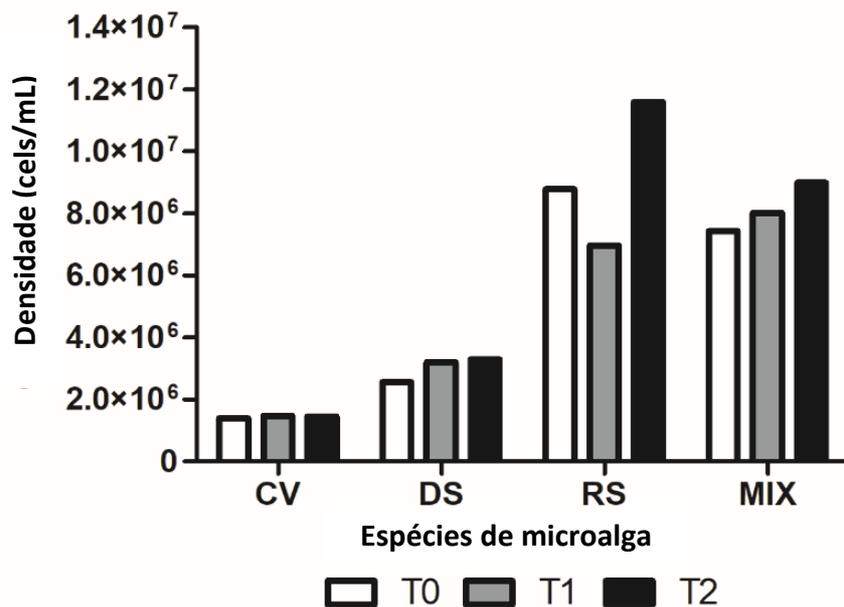
Após 3 horas de exposição (0,5 mg/L de EtBr em água mineral), não foram observadas grandes variações no número de algas/mL para 2 das 3 espécies avaliadas (*Chlorella vulgaris* e *Desmodesmus subspicatus*), começando e terminando com 10^6 algas/mL. No entanto a espécie *R. subcapitata* começou com 10^6 algas/mL e terminou com 10^7 algas/mL.

Duas espécies (*Chlorella vulgaris* e *Desmodesmus subspicatus*) e o Mix apresentaram crescimento na primeira hora sendo a que a microalga que apresentou maior taxa de crescimento em relação a sua densidade de alga iniciais foi da *D. subspicatus* (25%). Por outro lado, a *R. subcapitata* apresentou crescimento negativo, ou seja, uma mortalidade inicial (-21%) (Gráfico3). Esta inibição de crescimento também foi observada por DING et al. (2017) em ensaios com a espécie de microalga *Navicula* sp quando exposta ao Ibuprofeno em concentração acima de 50mg/L, no entanto em baixa concentração (0,1 – 1 mg/L) o Ibuprofeno estimulou o crescimento.

Ao final das três horas de exposição ao EtBr em bioensaio de batelada, todas as espécies apresentaram crescimento positivo. As espécies que obtiveram a maior taxa de crescimento em relação a sua densidade de algas iniciais foram na sequência: *R. subcapitata* (32%), *D. subspicatus* (29%), MIX (21%) e *C. vulgaris* (4%).

Nos ensaios realizados por MAES et al (2014) com 17 α -Ethinylestradiol (EE2), foi constatado que no período de até 24 h ocorreu uma maior absorção deste composto pela microalga *Desmodesmus subspicatus*. Já para os hormônios naturais (estrone e 17 β -estradiol) esse tempo foi muito inferior (2 e 10 minutos, respectivamente), apresentando uma rápida adsorção.

Gráfico 3 - Densidade das três espécies de microalgas (algas/mL) durante 3 horas de exposição ao Brometo de Etídio (0,5 mg/L) para avaliação de tratabilidade/remoção.



Legenda: Espécies de microalgas - *C. vulgaris* (CV); *D. subspicatus* (DS); *R. subcapitata* (RS); T0= 0h; T1= 1h; T2= 3h.

Fonte: O autor, 2018

4.3.2 Remoção de EtBr em números absolutos (sem considerar a densidade de algas)

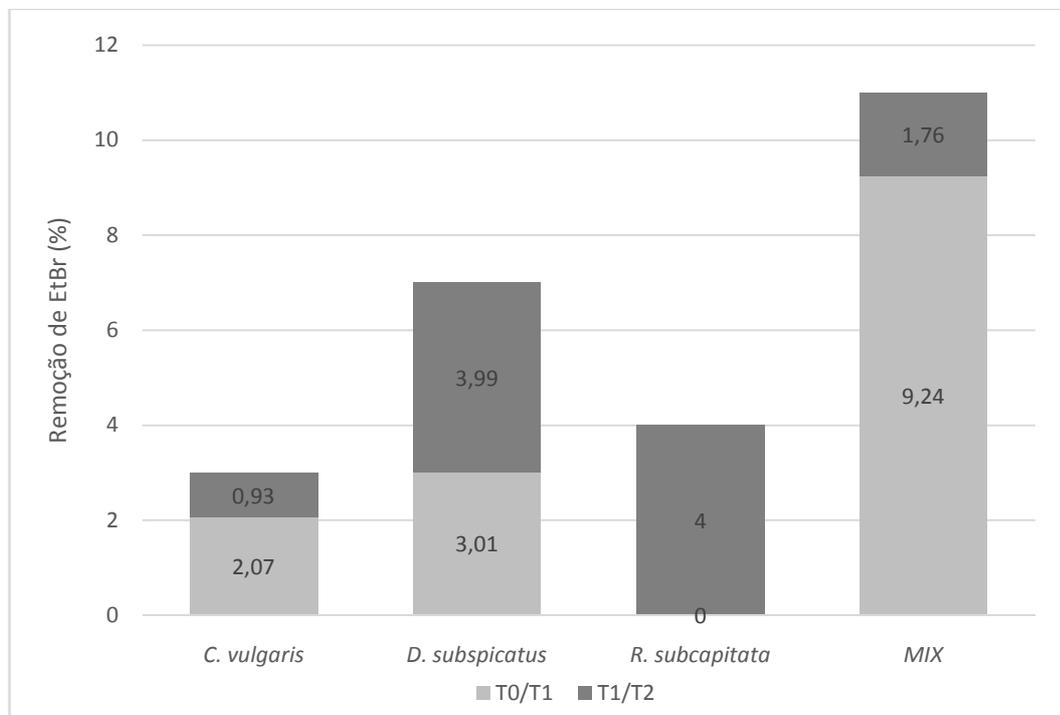
Para avaliar a remoção de EtBr em números absolutos, foram considerados os valores iniciais e finais de concentração de EtBr em água. Para esta avaliação, as densidades de microalgas (células/mL) não foram consideradas, apenas a capacidade de remover EtBr de cada espécie de microalga ou da mistura (Mix).

Os resultados obtidos na tratabilidade/remoção de EtBr para cada espécie de microalga e a mistura apresentaram um baixo percentual de remoção (<11%), no

entanto, vale ressaltar que grande parte da remoção foi realizada na primeira hora de exposição, com exceção de *R. subcapitata* que apresentou uma mortalidade inicial.

O MIX apresentou os melhores resultados de remoção durante a exposição de 3 h (11 %); no entanto, 84% desta remoção ocorreram na primeira hora. A *D. subspicatus* obteve 7% de remoção, sendo 43% na primeira hora. A *C. vulgaris* apresentou a menor taxa de remoção durante 3h (3%), no entanto, 69% ocorreram na primeira hora. O percentual de remoção do EtBr em cada período pelas três espécies de microalga e o MIX pode ser observado no Gráfico 4.

Gráfico 4 - Remoção percentual entre os períodos



No ensaio realizado com Triclosan com a microalga *Nannochloris* Sp. durante 14 dias foi identificado uma remoção rápida (0 – 4h) onde o composto presente no meio ficou abaixo de 28% da dose inicial de 10 µg/L em menos de 8h para a cultura com fase de clara e escura e abaixo de 41% para a cultura somente com a fase escura em 8 horas(BAI; ACHARYA, 2016).

Após analisar a capacidade de remoção do EtBr pelas microalgas individualmente e no Mix chegou-se aos seguintes resultados para 1h de tratamento (em ordem da maior remoção para a menor remoção): Mix > *D. subspicatus* > *C.*

vulgaris > *R. subcapitata*. Após 3h, os melhores resultados em valores absolutos foram: Mix > *D. subspicatus* > *R. subcapitata* > *C. vulgaris*.

4.3.3 Remoção de EtBr em números relativos (considerando a densidade populacional)

Para avaliar a remoção de EtBr em números relativos, considerou-se a concentração inicial e final de EtBr livre em água, porém esses dados foram comparados com a densidade inicial (algas/mL) de cada espécie e nos períodos de 1 h (T1) e 3 h (T2) (Tabela 4). Assim, foram avaliados os efeitos da densidade de cada espécie e o potencial de remoção de EtBr. Isso foi necessário, uma vez que os testes foram realizados com densidades próximas, porém não iguais. Sendo assim, a avaliação da remoção pode ser melhor expressa se for relativizada pela densidade.

Após esta análise, a classificação da eficiência de remoção em 1 h foi: *C. vulgaris* > MIX > *D. subspicatus* > *R. subcapitata*. A remoção total, após 3h foi: *D. subspicatus* > *C. vulgaris* > MIX > *R. subcapitata*.

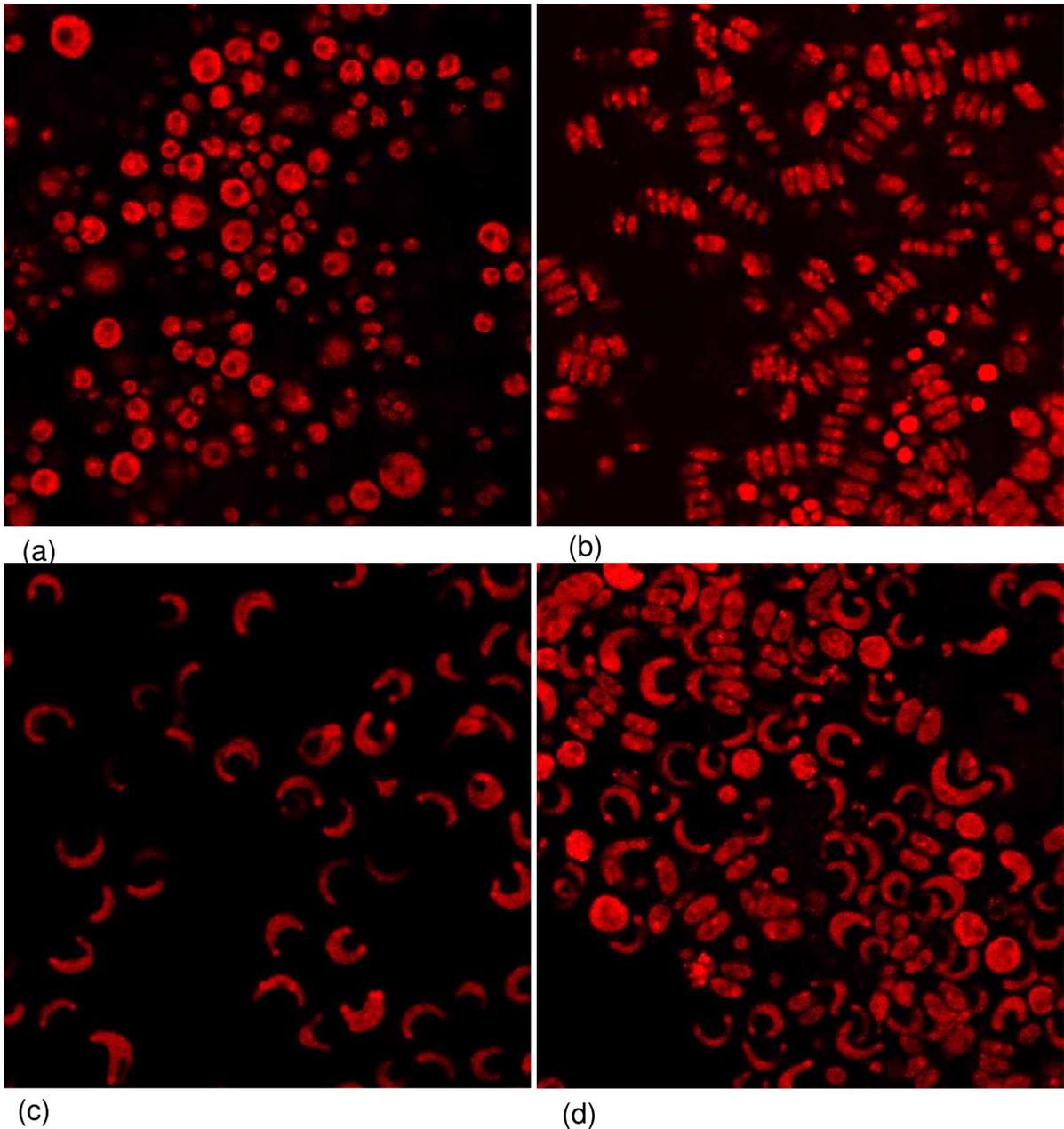
Tabela 4 - Remoção de EtBr (total e em intervalos de tempo), densidade de algas e densidade estimada necessária para o tratamento/remoção de EtBr para cada espécie

Alga	Tempo de amostra	Volume (mL)	Concentração Real(mgBrEt/L)	Densidade (Algae/mL)	Remoção relativa (EtBrng/alga)	Número estimado de para remoção total de EtBr
<i>C. vulgaris</i>	T0	1500	0.693	1.4x10 ⁶	-	-
	T1	1034	0.681	1.5x10 ⁶	8.9x10 ⁻⁶	5.6x10 ¹⁰
	T2	568	0.673	1.5x10 ⁶	5.2x10 ⁻⁶	9.7 x10 ¹⁰
	Números totais				1.4 x10 ⁻⁵	3.5 x10 ¹⁰
<i>D. subspicatus</i>	T0	1500	0.687	2.6x10 ⁶	-	-
	T1	1034	0.667	3.2x10 ⁶	8.1 x10 ⁻⁶	6.2 x10 ¹⁰
	T2	568	0.639	3.3x10 ⁶	8.6 x10 ⁻⁶	5.8 x10 ¹⁰
	Números totais				1.9 x10 ⁻⁵	2.6 x10 ¹⁰
<i>R. subcapitata</i>	T0	1500	0.638	8.8x10 ⁶	-	-
	T1	1034	0.638	7.0x10 ⁶	-	-
	T2	568	0.613	1.2x10 ⁷	3.6 x10 ⁻⁶	1.4 x10 ¹¹
	Números totais				2.8 x10 ⁻⁶	1.8 x10 ¹¹
MIX	T0	1500	0.682	7.4x10 ⁶	-	-
	T1	1034	0.618	8.0x10 ⁶	8.5 x10 ⁻⁶	5.9 x10 ¹⁰
	T2	568	0.609	9.0x10 ⁶	1.2 x10 ⁻⁶	4.3 x10 ¹¹
	Números totais				9.8 x10 ⁻⁶	5.1 x10 ¹⁰

4.3.4 Presença de EtBr nas espécies de microalgas

Para verificar a presença de EtBr (absorvido/adsorvido) nas espécies de microalgas selecionadas (membranas, citoplasma e núcleo), ao final do ensaio, as lâminas de cada tratamento foram fotografadas sob microscópio de fluorescência (Figura 10). A presença de EtBr em cada espécie de microalga pode ser verificada pela cor avermelhada. No entanto, apenas pela imagem, não foi possível distinguir a forma que o EtBr foi bioacumulado pelas microalgas. Assim como BAI & ACHARYA(BAI; ACHARYA, 2016)em seu ensaio com Tricosan não definiu se a extração foi bioacumulada(absorvida) ou adsorvida nas paredes das células. No entanto no estudo do mecanismo de remoção de 13 BifenilsPoliclorados com a alga *Chlamydomonas reinhardtii* foi identificado que a adsorção nas paredes da célula foi inferior a 10 % total bioacumuladono período coletados até 21 dias(JABUSCH; SWACKHAMER, 2004).

Figura 10 - Fotografia de microscópio de fluorescência (aumento de 63x; emissão $\lambda = 615$ nm e excitação $\lambda = 515$ nm) de microalgas 3h após exposição ao Brometo de Etídio (0,5 mg/L). Microalgas (a) *C. vulgaris*; (b) *D. subspicatus*; (b) *R. subcapitata*; (d) MIX.



4.3.5 Número estimado de algas para remoção total de EtBr

Com base nos resultados do tratamento/remoção de EtBr para cada espécie de microalga, bem como o Mix, foi possível estimar a densidade de cada espécie de microalgas necessária para a remoção total de EtBr (Tabela 4): 10^{10} algas/mL para *C. vulgaris*, *D. subspicatus* e Mix; e 10^{11} algas/mL para *R. subcapitata*.

A utilização de microalgas de forma concentrada para a remoção de outros compostos orgânicos (cafeína, ibuprofeno, galaxolida, fosfato de tributilo, 4-octilfenol, tris (2-cloroetil) fosfato e carbamazepina) em esgoto real ou sintético (em 10 dias) tem alcançado bons resultados (62 até 99%) (MATAMOROS et al., 2016).

A maior parte dos estudos que utilizam microalgas para o tratamento de efluentes dão maior foco na retirada de nutrientes, onde se percebe que um número bem menor de estudos é voltado para remoção de compostos orgânicos (MATAMOROS et al., 2015). A remoção de contaminante de fármacos e/ou hormônios em águas residuais (Tabela 5) por microalgas pode variar bastante de acordo com o composto e o tempo de exposição ao organismo. Algumas microalgas têm grande capacidade para remover alguns fármacos, mas menor capacidade para outros compostos, mesmo em um longo período de exposição. A *Chlorella sorokiniana*, possui capacidade de remover 100% de Ibuprofeno, paracetamol e metoprolol, porém não apresenta a mesma capacidade para remover Carbamazepina e trimethoprim (até 40%) mesmo em um ensaio com longo período de exposição de 744 horas (31 dias)(DE WILT et al., 2016).

Alguns estudos apresentam resultado de um consórcio de espécies para remoção de alguns compostos como o Ibuprofeno que foi removido 99% por consórcios de algas em escala de laboratório e piloto com água de esgoto urbano e água de esgoto urbano sintético (com nutriente e água subterrânea) respectivamente e não foi removido quando no ensaio com 4 microalgas (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella pyrenoidosa* e *Chlorella vulgaris*) em influente de esgoto com outros 34 fármacos, metais, nitrogênio, fósforo, produtos de cuidados pessoais e desreguladores endócrinos (MATAMOROS et al., 2015, 2016; ZHOU et al., 2014). A variação de remoção é geralmente influenciada e dependente das características dos contaminantes alvos e das condições climáticas e ambientais (DE-BASHAN; BASHAN, 2010).

ZHOU et al. (ZHOU et al., 2014) realizou ensaios com 50 compostos, como produtos farmacêuticos, de cuidados pessoais e de desregulação endócrina de esgoto de uma estação de tratamento (ETE) na China, e as quatro espécies de microalgas, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella. Vulgaris*, individualmente foram capazes de remover mais de 50%, de 32, 30, 28 e 31 produtos químicos respectivamente em 7 dias.

Tabela 5 - Eficiência de remoção de fármacos por algas em diversos tempos de monitoramento

Espécies de Alga	Contaminante e eficiência de remoção (%)	Tempo máximo do ensaio (h)	Matrizes Aquáticas	Referências
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Diclofenac (40–60), ibuprofen (100), paracetamol (100), metoprolol (100), carbamazepine (30), trimethoprim (40)	744	Urine, anaerobically treated black water and synthetic urine	Wilt, <i>et al.</i> , 2016
<i>Nannochloris</i> sp	Ibuprofen (40), trimethoprim (10), ciprofloxacina (100), carbamazepine (20), triclosan (100)	336	Lake Mead water	X. Bai, K. Acharya, 2017
Consórcios de microalgas em lagoas de alta taxa dominadas por <i>Chlorella</i> sp. e <i>Scenedesmus</i> sp.	Caffeine (99), ibuprofen (99), carbamazepine (20%),	240	Urbanorsyntheticwastewater	Matamoros, <i>et al.</i> , 2016
Consórcios de microalgas em fotobiorreatores de microalgas	Ketoprofen (36–85), naproxen (10–70), ibuprofen (98), acetaminophen (99), salicylicacid (33), paroxetine (94), lorazepam (30–60), alprazolam (87), atenolol (85–98), hydrochlorothiazide (44–84), erythromycin (85), azithromycin (89), ofloxacin (66), ciprofloxacina (47), diltiazem (72–77)	288	Lake water and pharmaceutical wastewater	Hom-Diaz, <i>et al.</i> , 2017
Consórcios de microalgas em tanques de algas de alta taxa	Caffeine (98), acetaminophen (99), ibuprofen (99), naproxen (89), carbamazepine (62), diclofenac (92), triclosan (95)	192	Urbanwastewater	Matamoros, <i>et al.</i> , 2015
Sistema macrófito aquático flutuante, <i>Iris pseudacorus</i> , <i>Scirpus</i> sp. e <i>Carex</i> sp., <i>Lemna</i> e algas flutuantes	Fluconazole (0–19), carbamazepine (0–15), diclofenac (65–71), venlafaxine (72–76), 2-hydroxy-CBZ (35–41), 3-hydroxy-CBZ (34–50), tramadol (54–62), oxazepam (27–37), sulfamethoxazole (49–53), trimethoprim (95–97), erythromycin (66–80), clarithromycin (51–70), metoprolol (73–75), atenolol (93–96), bezafibrate (73–80), acyclovir (92–97), codeine (92–95), diatrizoate (23–43), iomeprol (44–46)	*	Wastewaterinfluentandeffluents	Rühmland, <i>et al.</i> , 2015
<i>C. reinhardtii</i> , <i>S. obliquus</i> , <i>C. pyrenoidosa</i> , <i>C. vulgaris</i>	17 α -Boldenone (82–83), 17 β -boldenone (75–86), carbamazepine (4–15), carbendazim (14–30), ciprofloxacina (74–79), clarithromycin (100), climbazole (30–70), clofibricacid (0–30), diclofenac (0), enrofloxacin (75–77), erythromycin-H ₂ O (63–86), estrone (85–88), fluconazole (25–28), gemfibrozil (0), ibuprofen (0), lincomycin (80–81), norfloxacin (41–53), ofloxacin (43–52), paracetamol (88–94), progesterone (83–87), roxithromycin (87–94), salicylicacid (97–99), salinomycin (71–79), sulfadiazine (52–75), sulfadimethoxine (56–78), sulfameter (81–88), sulfamethazine (18–48), sulfamethoxazole (0–18), sulfamonomethoxine (0), sulfapyridine (98–100), testosterone (100), triclocarbon (81–99), triclosan (31–58), trimethoprim (0–37), tylosin (75–77)	168	Wastewaterinfluent	Zhou, <i>et al.</i> , 2014

Legenda - * Coletas realizadas em uma ETE no verão e inverno, não foi monitorado pelo tempo de exposição aos contaminantes.

Fonte: Modificada de Xiong, 2017 por Cavalcante

5 CONCLUSÃO

A fitorremediação tornou-se uma técnica promissora, devido às vantagens típicas dos tratamentos biológicos: baixo custo de manutenção, ausência de substâncias químicas nocivas e processos favoráveis ao meio ambiente, como geração de biomassa que pode ser utilizada na geração biocombustíveis, fertilizante e fixação de carbono (CO₂ atmosférico). Além das vantagens citada, também foi possível verificar a remoção e a produção de biomassa pelas três microalgas (*C. vulgaris*, *D. subspicatus* e *R. subcapitata*) e a mistura delas.

Os efeitos tóxicos do EtBr na espécie de microalga *Desmodesmus subspicatus* foram identificado, sendo a concentração limite para o lançamento e que não causa efeito de inibição de crescimento foi de 0,25 mg/L.

Nos ensaios com 2 meios, água mineral e meio de cultivo foi possível identificar a remoção do EtBr pela microalga *Raphidocelis subcapitata* nos dois tipos de meios e em duas concentrações (0,5 e 2,0 mg/L) do EtBr sendo 3,9% em 3 horas na concentração de 0,5 mg/L e 21% em 24h na concentração 2,0mg/L e a remoção pelas microalgas *Chlorella vulgaris* (3%), a *Desmodesmus subspicatus* (7%) e a mistura das três microalgas-MIX (10,7%) na concentração de 0,5mg/L em meio com água mineral. Uma das hipóteses para explicar o baixo percentual de remoção de EtBr (<11%), apresentado pelas espécies de algas selecionadas, pode estar relacionado ao número de organismos expostos, ou seja, densidade (algas/mL). Assim, a hipótese a ser testada num próximo experimento é que quanto maior o número de indivíduos expostos, menor será a dose individual, aumentando assim a chance de sobrevivência (menor efeito tóxico) e maior a eficiência de remoção.

Em relação ao potencial de remoção do EtBr das 3 espécies de microalgas e a comparação da eficiência de remoção e densidades de algas, foi possível concluir que a *Chlorella vulgaris*, uma vez utilizada em densidade inicial adequada, pode ser indicada para tratamento curto (de 1h) devido sua capacidade de remoção individual ser superior as outras microalgas e o MIX. Entretanto, essa espécie não apresentou boa produção de biomassa. A *D. subspicatus*, em densidade adequada, foi melhor avaliada para tratamentos mais longos (>3h), já que mostrou uma remoção crescente após 1h e mesmo após 3h de exposição de microalgas ao composto orgânico tóxico, a produção de biomassa foi de aproximadamente 30%.

6 RECOMENDAÇÕES FUTURAS

Com base nestes resultados preliminares, são propostos ensaios adicionais para testar diferentes níveis de parâmetros relevantes, tais como diferentes densidades iniciais de algas e concentrações iniciais de contaminantes.

Assim, o próximo passo será testar densidades de algas iniciais mais altas, níveis diferentes para os contaminantes e maiores tempos de exposição. A hipótese a ser testada é que, em densidades maiores de algas são maiores as chances de sobrevivência (devido à redução da toxicidade), assim uma maior eficiência de remoção.

Assim, a hipótese a ser testada num próximo experimento é que quanto maior o número de indivíduos expostos, menor será a dose individual, aumentando assim a chance de sobrevivência (menor efeito tóxico) e maior a eficiência de remoção.

Com base nestes resultados seria importante realizar com outros corantes intercalante concorrente do EtBr do mercado como: SYBR Green I, SYBR Green II, SYBR Gold, RedSafe e Gel Red e criar mecanismos de remoção rápida para evitar que estes e outros contaminantes cheguem a rede de esgoto por descarte inadequado ou involuntário durante a limpeza de vidraria e equipamentos em laboratórios.

Outros ensaios de tratabilidade também podem ser melhor explorados ou aprofundados como o de fotodegradação do EtBr em processos de fotocatalise heterogenia.

Como última recomendação é necessário um estudo das melhores formas ou condições de disposição final da biomassa de algas, após os estudos de tratabilidade do Brometo de Etídio (EtBr).

REFERÊNCIAS

- ABNT NBR 12648, A. B. DE N. T. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae)**Brasil, 2018.
- ACIÉN, F. G. et al. **Wastewater treatment using microalgae: how realistic a contribution might it be to significant urban wastewater treatment?***Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016.
- ALEXANDER, J. T.; HAI, F. I.; AL-ABOUD, T. M. Chemical coagulation-based processes for trace organic contaminant removal: Current state and future potential. **Journal of Environmental Management**, v. 111, p. 195–207, 2012.
- ALTMANN, J. et al. Direct comparison of ozonation and adsorption onto powdered activated carbon for micropollutant removal in advanced wastewater treatment. **Water Research**, 2014.
- ANVISA. **National Health Surveillance Agency. Resolution No. 222, March 2018. (Regulates the good practices of Healthcare waste and gives other arrangements).**
http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3427425/RDC_222_2018_.pdf/c5d3081d-b331-4626-8448-c9aa426ec41, 2018. Disponível em:
 <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3427425/RDC_222_2018_.pdf/c5d3081d-b331-4626-8448-c9aa426ec410>
- BAI, X.; ACHARYA, K. Removal of trimethoprim, sulfamethoxazole, and triclosan by the green alga *Nannochloris* sp. **Journal of Hazardous Materials**, 2016.
- BEN CHEKROUN, K.; SÁNCHEZ, E.; BAGHOUR, M. The role of algae in bioremediation of organic pollutants. **International Research Journal of Public and Environmental Health**, v. 1, n. 2, p. 19–32, 2014.
- BIOTECHNOLOGY, I. **Material Safety Data Sheet - RedSafe**. [s.l.: s.n.].
- BOEHLER, M. et al. Removal of micropollutants in municipal wastewater treatment plants by powder-activated carbon. **Water Science and Technology**, v. 66, n. 10, p. 2115–2121, 1 nov. 2012.
- BOLONG, N. et al. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. **Desalination**, 2009.

- BRASIL - CASA CIVIL. **CLT - Consolidação das Leis Trabalhistas** **DECRETO-LEI N.º 5.452, DE 1º DE MAIO DE 1943. Consolidação das Leis Trabalhistas** Brasil, 1943. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto-lei/Del5452.htm>
- BRASIL-MINISTÉRIO DA ECONOMIA - NR N°15. **Norma Regulamentadora n° 15 - Atividade e Operações Insalubres** Brasil, 1978.
- BRASIL-MINISTÉRIO DA ECONOMIA - NR N°9. **Norma Regulamentadora n° 9** Brasil, 1978.
- CAI, T.; PARK, S. Y.; LI, Y. **Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects** **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2013.
- CAMISASSA, M. Q. **Segurança e Saúde no Trabalho NRs 1 a 36 Comentadas e Descomplicadas**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.ebook-converter.com*****>.
- CCALA, C. C. OF A. O. **Desmodesmus subspicatus (R. Chodat) E. Hegewald et A. Schmidt | CCALA**. Disponível em: <<http://ccala.butbn.cas.cz/en/desmodesmus-subspicatus-r-chodat-e-hegewald-et-a-schmidt>>. Acesso em: 1 fev. 2019.
- CHAPOT, B. et al. Exposure to hazardous substances in a standard molecular biology laboratory environment: Evaluation of exposures in IARC laboratories. **Annals of Occupational Hygiene**, 2009.
- CONCIL, N. R. **Prudent Practices in the Laboratory**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.nap.edu>>.
- COOGAN, M. A. et al. Algal bioaccumulation of triclocarban, triclosan, and methyltriclosan in a North Texas wastewater treatment plant receiving stream. **Chemosphere**, 2007.
- CRAGGS, R. et al. High rate algal pond systems for low-energy wastewater treatment, nutrient recovery and energy production. **New Zealand Journal of Botany**, 2014.
- CRAGGS, R.; SUTHERLAND, D.; CAMPBELL, H. Hectare-scale demonstration of high rate algal ponds for enhanced wastewater treatment and biofuel production. **Journal of Applied Phycology**, 2012.
- CUELLAR-BERMUDEZ, S. P. et al. Nutrients utilization and contaminants removal. A

review of two approaches of algae and cyanobacteria in wastewater. **Algal Research**, 2017.

DA FONSECA, J. C. L. **AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA TRATAMENTO DE RESÍDUOS QUÍMICOS ORIGINADOS EM LABORATÓRIOS BIOLÓGICOS**. [s.l.] Universidade Estadual Paullista, 2006.

DANESHVAR, E. et al. Investigation on the feasibility of *Chlorella vulgaris* cultivation in a mixture of pulp and aquaculture effluents: Treatment of wastewater and lipid extraction. **Bioresource Technology**, 2018.

DE WILT, A. et al. Micropollutant removal in an algal treatment system fed with source separated wastewater streams. **Journal of Hazardous Materials**, 2016.

DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. **Bioresource Technology**, 2010.

ELUMALAI, S.; SARAVANAN, G. K. THE ROLE OF MICROALGAE IN TEXTILE DYE INDUSTRIAL WASTE WATER RECYCLE (PHYCOREMEDIATION). **Int J Pharm Bio Sci**, v. 7, n. 4, p. 662–673, 2016.

EU-OSHA. **European Agency for Safety and Health for Work**. Disponível em: <<https://osha.europa.eu/en>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

HANUMANTHA RAO, P. et al. Application of phycoremediation technology in the treatment of wastewater from a leather-processing chemical manufacturing facility. **Water SA**, v. 37, n. 1, p. 7–14, 2011.

HERNÁNDEZ-LEAL, L. et al. Removal of micropollutants from aerobically treated grey water via ozone and activated carbon. **Water Research**, 2011.

HOH, D.; WATSON, S.; KAN, E. **Algal biofilm reactors for integrated wastewater treatment and biofuel production: A review** **Chemical Engineering Journal**, 2016.

HOLLENDER, J. et al. Elimination of Organic Micropollutants in a Municipal Wastewater Treatment Plant Upgraded with a Full-Scale Post-Ozonation Followed by Sand Filtration. v. 43, n. 20, p. 7862–7869, 2009.

HOM-DIAZ, A. et al. Microalgae cultivation on wastewater digestate: β -estradiol and 17α -ethynylestradiol degradation and transformation products identification. **Journal**

of Environmental Management, 2015a.

HOM-DIAZ, A. et al. Microalgae cultivation on wastewater digestate: β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol degradation and transformation products identification. **Journal of Environmental Management**, v. 155, p. 106–113, 2015b.

HU, Q. et al. **Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances** **Plant Journal**, 2008.

HUERTA-FONTELA, M.; GALCERAN, M. T.; VENTURA, F. Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. **Water Research**, 2011.

JABUSCH, T. W.; SWACKHAMER, D. L. Subcellular accumulation of polychlorinated biphenyls in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2004.

JERMANN, D. et al. The role of NOM fouling for the retention of estradiol and ibuprofen during ultrafiltration. **Journal of Membrane Science**, 2009.

Jl, F. et al. Biomass production and nutrients removal by a new microalgae strain *Desmodesmus* sp. in anaerobic digestion wastewater. **Bioresource Technology**, 2014.

Jl, X. et al. The interactions of algae-bacteria symbiotic system and its effects on nutrients removal from synthetic wastewater. **Bioresource Technology**, v. 247, n. July 2017, p. 44–50, 2018.

KIM, I.; YAMASHITA, N.; TANAKA, H. Performance of UV and UV/H₂O₂ processes for the removal of pharmaceuticals detected in secondary effluent of a sewage treatment plant in Japan. **Journal of Hazardous Materials**, v. 166, n. 2-3, p. 1134–1140, 2009.

KIRSANOV, K. I. et al. SYBR Gold and SYBR Green II are not mutagenic in the Ames test. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 699, p. 1–4, 2010.

KOVALOVA, L. et al. Hospital wastewater treatment by membrane bioreactor: Performance and efficiency for organic micropollutant elimination. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 3, p. 1536–1545, 2012.

LABOR, U. . . D. OF. **OSH Act of 1970.**

LAPWORTH, D. J. et al. Persistent and emerging micro-organic contaminants in Chalk groundwater of England and France. **Environmental Pollution**, 2015.

LEPECQ, J.-B.; PAOLETTI, C. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. **Journal of Molecular Biology**, v. 27, n. 1, p. 87–106, 1967.

LIU, W. et al. Removal and biodegradation of 17 β -estradiol and diethylstilbestrol by the freshwater microalgae raphidocelis subcapitata. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 3, p. 452, 2018.

LUO, Y. et al. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v. 473-474, p. 619–641, 2014a.

LUO, Y. et al. **A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment** **Science of the Total Environment**, 2014b.

MAES, H. M. et al. Uptake, elimination, and biotransformation of 17 α -ethinylestradiol by the freshwater alga *Desmodesmus subspicatus*. **Environmental Science and Technology**, 2014.

MAILLER, R. et al. Removal of emerging micropollutants from wastewater by activated carbon adsorption: Experimental study of different activated carbons and factors influencing the adsorption of micropollutants in wastewater. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 2016.

MATAMOROS, V. et al. Capability of microalgae-based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants: A pilot-scale study. **Journal of Hazardous Materials**, 2015.

MATAMOROS, V. et al. Assessment of the mechanisms involved in the removal of emerging contaminants by microalgae from wastewater: A laboratory scale study. **Journal of Hazardous Materials**, 2016.

MATAMOROS, V.; SALVADÓ, V. Evaluation of a coagulation/flocculation-lamellar clarifier and filtration-UV-chlorination reactor for removing emerging contaminants at full-scale wastewater treatment plants in Spain. **Journal of Environmental Management**, v. 117, p. 96–102, 2013.

- MUÑOZ, R.; GUIEYSSE, B. **Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review** *Water Research*, 2006.
- MURRAY, K. E.; THOMAS, S. M.; BODOUR, A. A. **Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment** *Environmental Pollution*, 2010.
- NCBI. PUBCHEM - ETHIDIUM BROMIDE _ C21H20N3. 2019.
- NIOSH, O. **OSHA, 2014 Lab_Standard 29 CFR 1910.1450**, 2014.
- NORVILL, Z. N.; SHILTON, A.; GUIEYSSE, B. **Emerging contaminant degradation and removal in algal wastewater treatment ponds: Identifying the research gaps** *Journal of Hazardous Materials*, 2016.
- ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO TRABALHO. C170 - Segurança no Trabalho com Produtos Químicos. p. 1–11, 1990.
- OROS, D. R. et al. Surveillance for previously unmonitored organic contaminants in the San Francisco Estuary. **Marine Pollution Bulletin**, 2003.
- OSHA. **Laboratory Safety Guidance**. [s.l: s.n.].
- PACHECO, M. M. et al. Microalgae: Cultivation techniques and wastewater phycoremediation. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, 2015.
- PENG, F. Q. et al. Biotransformation of progesterone and norgestrel by two freshwater microalgae (*Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*): Transformation kinetics and products identification. **Chemosphere**, 2014.
- PETRIE, B.; BARDEN, R.; KASPRZYK-HORDERN, B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. **Water Research**, 2014.
- PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA - CASA CIVIL. **Decreto nº 8123**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-2014/2013/Decreto/D8123.htm>. Acesso em: 28 fev. 2019.
- PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, P. DA R. C. C. S. PARA A. J. **Medida Provisória nº 870**, 2019. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2019-2022/2019/Mpv/mpv870.htm>

RAMARAJ, R.; DUSSADEE, N. **Cultivation of Green Microalga, Chlorella vulgaris for Biogas Purification Bioethanol production View project not from any projects View project** *International Journal of New Technology and Research*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.ijntr.org>.

REUNGOAT, J. et al. Removal of micropollutants and reduction of biological activity in a full scale reclamation plant using ozonation and activated carbon filtration. **Water Research**, v. 44, n. 2, p. 625–637, 2010.

ROTH, C. **Safety data sheet - Ethidium bromide**. [s.l: s.n.].

SAEIDNIA, S.; ABDOLLAHI, M. **Are other fluorescent tags used instead of ethidium bromide safer?** *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013.

SAHAR, E. et al. The use of RO to remove emerging micropollutants following CAS/UF or MBR treatment of municipal wastewater. **Desalination**, v. 273, n. 1, p. 142–147, 2011.

SALEM, N. A. et al. Ozone Therapy in Ethidium Bromide-Induced Demyelination in Rats: Possible Protective Effect. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 2016.

SALOMÃO, A. L. D. S. et al. Effects of single and mixed estrogens on single and combined cultures of *D. subspicatus* and *P. subcapitata*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 93, n. 2, p. 215–221, 2014.

SAMORÌ, G. et al. Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: Part I. **Water Research**, 2013.

SANTOS, L. H. M. L. M. et al. **Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment** *Journal of Hazardous Materials*, 2010.

SAYAS, E.; GARCÍA-LÓPEZ, F.; SERRANO, R. Toxicity, mutagenicity and transport in *Saccharomyces cerevisiae* of three popular DNA intercalating fluorescent dyes. **Yeast**, 2015a.

SAYAS, E.; GARCÍA-LÓPEZ, F.; SERRANO, R. Toxicity, mutagenicity and transport in *Saccharomyces cerevisiae* of three popular DNA intercalating fluorescent dyes. **Yeast**, v. 5, p. 595–606, 2015b.

SDS BIO-RAD. EthidiumBromide Safety Data Sheet - BIO RAD. p. 1–17, 2015.

SDS BIO-RAD. **Safety data sheet: Ethidium Bromide Solution 10 mg/ml.**
California: [s.n.].

SHEN, Y.; GAO, J.; LI, L. Municipal wastewater treatment via co-immobilized microalgal-bacterial symbiosis: Microorganism growth and nutrients removal. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 905–913, 2017.

SHI, W. et al. Removal of estrone, 17 α -ethinylestradiol, and 17 β -estradiol in algae and duckweed-based wastewater treatment systems. **Environmental Science and Pollution Research**, 2010.

SINGER, V. L.; LAWLOR, T. E.; YUE, S. Comparison of SYBR[®] Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test). **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 1999.

SINGH, S. P.; SINGH, P. **Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2015.

SOCIAL, P. **decreto-3048-6-maio-1999-368532-normaatuizada-pe**, 1999.

STAMM, C. et al. **Micropollutant removal from wastewater: Facts and decision-making despite uncertainty** *Environmental Science and Technology*, 2015.

STUART, M. et al. **Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater** *Science of the Total Environment*, 2012.

SUAREZ, S.; LEMA, J. M.; OMIL, F. Pre-treatment of hospital wastewater by coagulation-flocculation and flotation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2138–2146, 2009a.

SUAREZ, S.; LEMA, J. M.; OMIL, F. Pre-treatment of hospital wastewater by coagulation-flocculation and flotation. **Bioresource Technology**, 2009b.

SUTHERLAND, D. L. et al. **Enhancing microalgal photosynthesis and productivity in wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production** *Bioresource Technology*, 2015.

TECNOLOGIES, L. **Safety Data Sheet - SYBR Gold**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.lifetechnologies.com>.

WARING, M. J. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. 269–282, 1965.

WESTERHOFF, P. et al. Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 17, p. 6649–6663, 2005.

XIONG, J. Q. et al. Ciprofloxacin toxicity and its co-metabolic removal by a freshwater microalga *Chlamydomonas mexicana*. **Journal of Hazardous Materials**, 2017.

XIONG, J. Q.; KURADE, M. B.; JEON, B. H. Biodegradation of levofloxacin by an acclimated freshwater microalga, *Chlorella vulgaris*. **Chemical Engineering Journal**, 2017.

XIONG, J. Q.; KURADE, M. B.; JEON, B. H. **Can Microalgae Remove Pharmaceutical Contaminants from Water? Trends in Biotechnology**, 2018.

YANGALI-QUINTANILLA, V. et al. Nanofiltration vs. reverse osmosis for the removal of emerging organic contaminants in water reuse. **Desalination and Water Treatment**, v. 34, n. 1-3, p. 50–56, 2011.

YU, Y. et al. Investigation of the removal mechanism of antibiotic ceftazidime by green algae and subsequent microbial impact assessment. **Scientific Reports**, 2017.

YURIKO OUCHI, R. “**Avaliação dos Efeitos do Brometo de Etídio em *Drosophila melanogaster* (Diptera-Drosophilidae)**”. [s.l: s.n.].

ZHOU, G. J. et al. Simultaneous removal of inorganic and organic compounds in wastewater by freshwater green microalgae. **Environmental Sciences: Processes and Impacts**, 2014.