



UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE

LUCIANO HENRIQUE PINTO

**AVALIAÇÃO DO RISCO E PERIGO DE TOXICIDADE AMBIENTAL DE  
EFLUENTES ORIGINADOS DE DEGRADAÇÃO DE 17 $\beta$  ESTRADIOL E  
ANÁLOGOS POR PROCESSO OXIDATIVO AVANÇADO OZÔNIO/UV  
POR ALGAS *E. gracilis***

JOINVILLE

FEVEREIRO DE 2019

LUCIANO HENRIQUE PINTO

**AVALIAÇÃO DO RISCO E PERIGO DE TOXICIDADE AMBIENTAL POR ALGAS  
*Euglena gracilis* DE EFLUENTES ORIGINADOS DE DEGRADAÇÃO DE 17 $\beta$   
ESTRADIOL E ANÁLOGOS POR PROCESSO OXIDATIVO AVANÇADO  
OZÔNIO/UV**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville para a obtenção do Grau de Doutor em Saúde e Meio Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger.

JOINVILLE

FEVEREIRO DE 2019

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

Pinto, Luciano Henrique

P659a Avaliação do risco e perigo de toxicidade ambiental por algas *Euglena gracilis* de efluentes originados de degradação de 17 $\beta$  estradiol e análogos por processo oxidativo avançado ozônio/UV / Luciano Henrique Pinto; orientador Dr. Gilmar Sidnei Erzinger. – Joinville: UNIVILLE, 2019

93 f. : il. ; 30 cm

Tese (Doutorado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)

1. *Euglena gracilis*. 2. Testes de toxicidade. 3. Lixo - Eliminação. I. Erzinger, Gilmar Sidnei (orient.). II. Título.

CDD 363.728

Elaborada por Rafaela Ghacham Desiderato – CRB-14/1437

Termo de Aprovação

“Avaliação do Risco e Perigo de Toxicidade Ambiental por Algas do Gênero *Euglena gracilis* de Efluentes originados de Degradação de 17 $\beta$  estradiol e análogos por Processo Oxidativo Avançado de Ozônio/UV”

por

Luciano Henrique Pinto

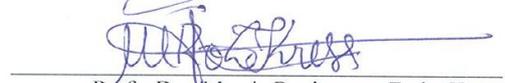
Tese julgada para a obtenção do título de Doutor em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.

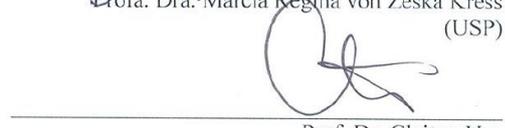
  
Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger  
Orientador (UNIVILLE)

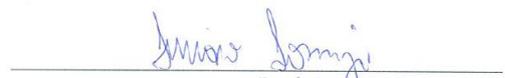
  
Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

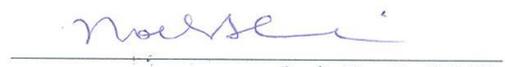
Banca Examinadora:

  
Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger  
Orientador (UNIVILLE)

  
Profa. Dra. Marcia Regina von Zeska Kress  
(USP)

  
Prof. Dr. Cleiton Vaz  
(UDESC)

  
Prof. Dr. Luciano Lorenzi  
(UNIVILLE)

  
Profa. Dra. Noeli Sellin  
(UNIVILLE)

Joinville, 22 de fevereiro de 2019

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que me ajudaram nessa caminhada. Professores e Mestres que fizeram a diferença nesta caminhada. Aos alunos de Iniciação Científica pelo apoio nas atividades, em especial: Julia Carolina Soares, Thais Francine, Matheus Mews Ruela, Lucas Langhs.

Gratidão aos colegas da II Turma de Doutorado em Saúde e Meio Ambiente

A Univille, por me proporcionar esta oportunidade!



## RESUMO

No mundo inteiro a presença de interferentes endócrinos (IE) como o  $17\beta$  estradiol e análogos tem sido identificado. Resultado de diversos fatores como: descarte doméstico indevido; uso veterinário não recomendado; e restos de produção das indústrias farmacêuticas e de fármacos, apontam para um grande perigo ambiental de tais poluentes. Frente a esta situação vários processos de remoção são empregados, como os Processos Oxidativos Avançados (POA) porém sem saber o potencial perigo dos novos compostos formados. A presente pesquisa pretende investigar a influência que  $17\beta$  estradiol e análogos que podem causar no nível trófico primário, usando para isso biotestes envolvendo algas do gênero *E. gracilis*, para se ter um parâmetro para assim avaliar também o perigo dos Compostos Originados de Degradação (CODs) destes IEs quando no uso de processos oxidativos a base de ozônio ultravioleta, para estimar sua influência na diminuição ou geração de novo do perigo de ecotoxicidade. A metodologia utilizada, foi um estudo experimental, realizado no Laboratório de Fotoquímica e Fotobiologia e no Laboratório de Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville; envolvendo o uso de algas do gênero *E. gracilis*. Foram avaliadas alterações comportamentais; atividades fotossintéticas e alterações na concentração de clorofila primeiro em Solução Padrão Controle (SPC) feita em laboratório, para conhecer as alterações nas algas, e depois no efluente de uma farmácia de manipulação de hormônios a fim de verificar a reprodutibilidade dos resultados. Após essa etapa fez o POA tanto da SPC quanto do efluente. Os mesmos procedimentos foram estendidos a outros laboratórios da Farmácia de Manipulação para efeito de comparação. Conclui-se que, houve alterações significativas no comportamento das algas do gênero *E. gracilis*, entre os quatro laboratórios em condições de comparações, contendo amostras do efluente bruto, efluente tratado e controle, sendo eles: hormônios; sólidos; dermocosméticos; e psicotrópicos. É correto que se tenha que buscar meios de eliminar esses compostos dos recursos hídricos, mas não se pode cometer o mesmo erro ignorando o que os compostos originados podem causar no meio ambiente, para que no futuro não se tenha que rever processos criados com o intuito de gerar benefícios, mas limitados por gerarem efeitos secundários de risco.

**Palavras-chave:** Ecotoxicidade. Efluente bruto. Efluente tratado. *E. gracilis*. Processo Oxidativo Avançado.

## ABSTRACT

The presence of endocrine disruptors (ED) such as 17 $\beta$ -estradiol and the like have been identified. Result of several factors such as: undue domestic discard; veterinary use not recommended; and remnants of the pharmaceutical and pharmaceutical industries, point to a major environmental hazard of such pollutants. Facing this situation several processes of removal are employed, such as advanced oxidative processes (AOP), but without knowing the potential danger of the new compounds formed. The present research intends to investigate the influence that 17 $\beta$  estradiol and analogues can cause in the primary trophic level, using biotestes involving algae of the genus *E. gracilis*, to have a parameter to thus also evaluate the danger of the compounds originating from degradation (CODs ) of these EDs when using oxidative processes based on ultraviolet ozone, to estimate their influence on the decrease or re-generation of the danger of ecotoxicity. The methodology used was an experimental study carried out at the Laboratory of Photochemistry and Photobiology and at the Laboratory of the Environment of the University of the Region of Joinville; involving the use of algae of the genus *E. gracilis*. Behavioral changes were evaluated; photosynthetic activities and changes in chlorophyll concentration first in a standard control solution (SCS) made in the laboratory to know the changes in algae, and then in the effluent of a hormone manipulation pharmacy in order to verify the reproducibility of the results. After this step made the AOP of both the SCS and the effluent. The same procedures were extended to other Laboratories of Manipulation laboratories for comparison purposes. It was concluded that, there were significant alterations in the behavior of the algae of the genus *E. gracilis*, among the four laboratories under comparative conditions, containing samples of the raw effluent, treated effluent and control, being: hormones; solid; dermocosmetic and psychotropic. It is correct to find ways to eliminate these compounds from water resources, but one can not make the same mistake ignoring what the compounds originate can cause in the environment, so that in the future one does not have to review processes created with the intention to generate benefits, but limited by generating risky side effects.

Keywords: Ecotoxicity. Gross effluent. Treated effluent. *E. gracilis*. Advanced Oxidative Process

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	<i>E. gracilis</i> .....	22
<b>Figura 2</b>	Mecanismo de dissipação de energia na forma de calor .....	24
<b>Figura 3</b>	Interferentes endócrinos de caráter lipofílicos bem comercializados e manipulados em Farmácias Magistrais, e que apresentam ações deletérias ao meio ambiente. ....	26
<b>Figura 4</b>	Acoplamento do 17 $\beta$ -estradiol nas hélices proteicas, sendo a principal ligação a que ocorre em na região da hélice 6 (H6), conhecida como ligação farmacofórico. ....	27
<b>Figura 5</b>	Remoção da hidroxila do HTM levando a não ação hormonal em células. ....	32
<b>Figura 6</b>	Processo de formação da hidroxila altamente reativa. ....	33
<b>Figura 7</b>	Prováveis mecanismos de formação de CODs mais complexos que não apresentam atividade estrogênica. No processo a esquerda tem se a formação de um fenol tetrassubstituído, enquanto que no mecanismo a direita a abertura do anel com formação de ácido carboxílico e aldeído... ..	34
<b>Figura 8</b>	Intermediários já identificados. Em pH 7,0 encontra-se a maior parte dos CODs conhecidos.....	34
<b>Figura 9</b>	Prováveis CODs formados, com presença de moléculas conhecidas e compostos orgânicos de menor número de carbonos. ....	36
<b>Figura 10</b>	Esquema geral do estudo, considerando o estudo de IE preparado em bancada, para servir de parâmetro para a análise dos efluentes, e as variáveis em estudo; comportamental; e energética. ....	37
<b>Figura 11</b>	Esquema de remoção do IEs no Laboratório de Fotoquímica e Fotobiologia. ....	40
<b>Figura 12</b>	Esquema ilustrativo do preparo das culturas, retirando alíquota da cultura e adição da amostra a ser estudada. ....	43
<b>Figura 13</b>	Esquema de funcionamento do NG TOX. ....	44
<b>Figura 14</b>	Avaliação da influência da remoção de HTMs, sobre a concentração de clorofila e eficiência global fotossintética. ....	46
<b>Figura 15</b>	Avaliação da influência da remoção de HTMs, sobre os comportamentos das algas nas condições testadas. ....	46
<b>Figura 16</b>	Avaliação da influência das modificações comportamentais frente as variáveis energéticas. ....	47
<b>Figura 17</b>	Avaliação da alteração da concentração de clorofila e eficiência global fotossintética. ....	47

<b>Figura 18</b>	Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk) ( $P < 0,050$ ). $H = 17,461$ com 5 graus de liberdade. ( $P = 0,004$ ). As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado por acaso; existe uma diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,004$ ). ..... 48
<b>Figura 19</b>	Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk) ( $P < 0,050$ ). $H = 17,461$ com 5 graus de liberdade. ( $P = 0,004$ ). As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado por acaso; existe uma diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,004$ ). ..... 50
<b>Figura 20</b>	Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk) ( $P < 0,050$ ). $H = 17,461$ com 5 graus de liberdade. ( $P = 0,004$ ). As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado por acaso; existe uma diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,004$ ). ..... 51
<b>Figura 21</b>	Cromatograma detectando presença de IE no LMH. .... 52
<b>Figura 22</b>	Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk) ( $P < 0,050$ ). $H = 17,461$ com 5 graus de liberdade. ( $P = 0,004$ ). As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado por acaso; existe uma diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,004$ ). ..... 53
<b>Figura 23</b>	Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk) ( $P < 0,050$ ). $H = 17,461$ com 5 graus de liberdade. ( $P = 0,004$ ). As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado por acaso; existe uma diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,004$ ). ..... 54
<b>Figura 24</b>	Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk) ( $P < 0,050$ ). $H = 17,461$ com 5 graus de liberdade. ( $P = 0,004$ ). As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado por acaso; existe uma diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,004$ ). ..... 55
<b>Figura 25</b>	Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk) ( $P < 0,050$ ). $H = 17,461$ com 5 graus de liberdade. ( $P = 0,004$ ). As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado por acaso; existe uma diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,004$ ). ..... 56
<b>Figura 26</b>	Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk) ( $P < 0,050$ ). $H = 17,461$ com 5 graus de liberdade. ( $P = 0,004$ ). As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado por acaso; existe uma diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,004$ ). ..... 57
<b>Figura 27</b>	Modelo de remoção feita por Bila et al. (2007) apontando as bandas utilizadas para análise e quantificação de presença do grupo farmacofórico: Hidroxila trissubstituída com porção monofenólica. Tempo de exposição ao POA $O_3/UV$ expresso em minutos (T0/T90/T100/T110/T120). ..... 59
<b>Figura 28</b>	Teste de Wilcoxon: Z-Statistic (com base em classificações positivas) = 3,734. $P$ (est.) = $< 0,001$ $P$ (exato) = $< 0,001$ . A correção de Yates para a continuidade foi usada no cálculo desse teste. .... 60
<b>Figura 29</b>	CG MS das amostras retiradas nos tempos 0, 100, 110 e 120 minutos. .... 61

<b>Figura 30</b>	Bandas identificadas no infravermelho tempo zero, contendo apenas o valerato de 17 $\beta$ -estradiol.....	62
<b>Figura 31</b>	Bandas identificadas no infravermelho tempo 120 minutos, contendo outro composto.....	63
<b>Figura 32</b>	Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk) (P <0,050). H = 17,461 com 5 graus de liberdade. (P = 0,004). As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado por acaso; existe uma diferença estatisticamente significativa (P = 0,004). .....	65
<b>Figura 33</b>	Perfil do rendimento fotossintético efetivo de PSII em <i>E. gracilis</i> tratadas com resíduos de diferentes tempos de remoção de estradiol em diferentes tempos. ....	66
<b>Figura 34</b>	Comparação da Eficiência Global Fotossintética (valores x 10 <sup>-1</sup> ) das algas frente a exposição de resíduos em diferentes tempos de remoção de estradiol via POA Teste de Wilcoxon: Z-Statistic (com base em classificações positivas) = 3,181. P (est.) = 0,002 P (exato) = <0,001. A correção de Yates para a continuidade foi usada no cálculo desse teste. ....	67
<b>Figura 35</b>	Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk) (P = 0,132). A diferença nos valores médios entre os dois grupos não é suficientemente grande para excluir a possibilidade de que a diferença se deve à variabilidade aleatória da amostragem; não há diferença estatisticamente significativa (P = 0,093). .	68
<b>Figura 36</b>	Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk) Falha (P <0,050). A diferença nos valores médios entre os dois grupos não é suficientemente grande para excluir a possibilidade de que a diferença se deve à variabilidade aleatória da amostragem; não há diferença estatisticamente significativa (p = 0,065). .....	69
<b>Figura 37</b>	Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk) Falha (P <0,050). A diferença nos valores médios entre os dois grupos é maior do que seria esperado por acaso; há uma diferença estatisticamente significativa (p = 0,002). .....	70
<b>Figura 38</b>	Cromatograma em CGMS mostrando ausência de IE após POA/UV por 120 minutos.....	71
<b>Figura 39</b>	Alterações nos parâmetros comportamentais de <i>E. gracilis</i> expostas a efluentes pós ozonização do Laboratório de hormônios, comparados com o efluente bruto. Teste de correlação de Pearson: Existem relações significativas entre pares de variáveis (P> 0,050). .....	72
<b>Figura 40</b>	<b>Influência sobre a concentração de clorofila. Análise de Variância em Variantes</b> Kruskal-Wallis. H = 7,812 com 2 graus de liberdade. P (est.) = 0,020 P (exato) = 0,011. As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado por acaso; há uma diferença estatisticamente significativa (P = 0,011). .....	73
<b>Figura 41</b>	<b>Influência da quantidade produzida versus concentração de clorofila pré ozonização.</b> Teste de correlação de Pearson: alteração na concentração de clorofila do laboratório (P> 0,050). .....	74

**Figura 42** **Comparação entre concentração de clorofila e eficiência global fotossintética.** Análise de Variância em Variantes Kruskal-Wallis.  $H = 7,812$  com 2 graus de liberdade.  $P$  (est.) = 0,020  $P$  (exato) = 0,011. As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado por acaso; há uma diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,011$ ). ..... 75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Enfermidades causadas pelos IEs descritos na literatura. ....	28
<b>Tabela 2</b>	Enfermidades causadas pelos IEs descritos em literatura. ....	29
<b>Tabela 3</b>	Número de formulações produzidas de janeiro a julho de 2014. ....	52

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação (1).....	38
Equação (2).....	41
Equação (3).....	45
Equação (4).....	45

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>1.1</b>	<b>Contaminação ambiental pelos estabelecimentos de saúde: advento dos poluentes emergentes advindos de medicamentos e outras substâncias ....</b>	<b>17</b>
<b>1.2</b>	<b>Interferentes Endócrinos e sua ação como poluente emergente .....</b>	<b>18</b>
<b>1.3</b>	<b>Uso de biotestes para avaliação de risco ou perigo no nível trófico primário</b>	<b>18</b>
<b>1.4</b>	<b>Hormônio 17<math>\beta</math> estradiol e análogos: seu uso terapêutico e sua atuação como poluente emergente e seus impactos ambientais.....</b>	<b>19</b>
<b>1.5</b>	<b>Estratégias de remoção de 17<math>\beta</math> estradiol e seus análogos e a formação de Compostos Originados na Degradação (CODs) .....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1</b>	<b>Interferentes endócrinos: definição e sua ação no meio ambiente.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Análogos estruturais do estradiol como interferentes endócrinos: aspectos químicos relevantes para sua ação biológica e sua interação química com receptor biológico.....</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>Esquema Geral das Análises .....</b>	<b>37</b>
<b>4.2</b>	<b>Delineamento do estudo .....</b>	<b>37</b>
<b>4.3</b>	<b>Preparo das soluções padrão controle e coleta dos efluentes .....</b>	<b>38</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Solução Padrão para Controle - SPC.....</b>	<b>38</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Aspectos relativos ao local da coleta.....</b>	<b>38</b>
<b>4.3.2.1</b>	<b>Estimativa de produção dos laboratórios da Farmácia Magistral.....</b>	<b>38</b>
<b>4.3.2.2</b>	<b>Coleta de efluentes do laboratório de hormônios e demais laboratórios.....</b>	<b>39</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Ajuste de pH.....</b>	<b>39</b>
<b>4.4</b>	<b>Processo de remoção dos IEs via O<sub>3</sub>/UV e coleta nos tempos para estudos</b>	<b>40</b>

4.5	<b>Avaliação da percentagem de remoção do grupo farmacológico (HTM) ..</b>	<b>41</b>
4.6	<b>Confirmação remoção de 17<math>\beta</math>-estradiol e valerato de estradiol via CGMS nos tempos apontados no UV .....</b>	<b>41</b>
4.7	<b>Análise com espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier - FTIR .....</b>	<b>42</b>
4.8	<b>Estudos sobre a influência dos IEs e CODs sobre o nível trófico primários, usando <i>E. gracilis</i> como marcador de risco.....</b>	<b>42</b>
4.8.1	Preparo das Culturas Testes (CT) de <i>E. gracilis</i> para o contato com as amostras em estudo.....	42
4.8.2	Teste de avaliação de alterações comportamentais das algas pelo biomonitoramento via NG TOX.....	43
4.8.3	Teste de alterações energéticas: eficiência fotossintética e de eficiência global fotossintética.....	45
4.8.4	Teste de alterações energéticas: Teste de variação da concentração de clorofila 46	
4.9	<b>Análises estatísticas .....</b>	<b>46</b>
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
5.1	<b>Análise das alterações comportamentais e energéticas das algas <i>E. gracilis</i> frente ao IE padrão preparado em solução estoque: Teste em solução padrão controle – SPC .....</b>	<b>48</b>
5.1.1.1	Influência atividade energética: alteração na concentração de clorofila a .....	49
5.2	<b>Remoção da atividade estrogênica presente nos efluentes e submissão a cultura de algas do CODs formados, com posterior comparação dos resultados encontrados com a exposição dos CODs obtidos na solução padrão controle.....</b>	<b>71</b>
5.2.1.1	Influência dos CODs formados em efluentes tratados sobre o comportamento e concentração de clorofila nas algas, e a relação entre estas duas últimas variáveis.....	71
6	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>77</b>
	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>79</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Contaminação ambiental pelos estabelecimentos de saúde: advento dos poluentes emergentes advindos de medicamentos e outras substâncias

No mundo todo tem sido identificada a presença de fármacos, resíduos de produtos de higiene e saúde e interferentes endócrinos nas águas. Esses compostos são classificados atualmente como “poluentes emergentes”. Essa contaminação advém de diversos fatores como: descarte doméstico indevido; uso veterinário não recomendado (exacerbado); e contaminação de unidades de produção desses produtos; que faz com que tais compostos cheguem até os lençóis freáticos em quantidades que antes eram consideradas insignificantes, mas que agora denotam algum tipo de risco ou perigo ambiental. (VERLICCHI et al., 2012).

As condições anteriormente citadas vêm causando uma preocupação crescente na comunidade científica quanto à contaminação dos recursos hídricos por estes denominados “poluentes emergentes” (SCHINDLER et al., 2018), dentre os quais podem se destacar os advindos de produtos farmacêuticos - como resíduos de medicamentos e seus derivados. (AHMED et al., 2011). Tal situação vem chamando a atenção de pesquisadores pelo desconhecimento do potencial ecotoxicológico de tais produtos. (DE BARROS, 2018).

Uma ressalva importante quanto à questão toxicológica está relacionada à concentração encontrada. Presente em pequenas quantidades no meio ambiente - o que em princípio não traria complicações imediatas à saúde humana - vem causando riscos ambientais e complicações para a saúde humana, devido à exposição crônica, condição esta que vem sendo amplamente estudada (KOCK-SCHULMEYER et al., 2011). Tal condição merece atenção especial porque são escassos, ou, praticamente inexistentes os métodos que removam estes poluentes, sendo as pesquisas nestes campos ainda incipientes, porém promissoras.

Estabelecimentos de saúde de uma forma geral tem contribuído para esse tipo de poluição, como as Farmácias Magistrais. Na última década, a porcentagem de prescrições manipuladas correspondeu a uma parcela significativa do total de prescrições realizadas no país, alcançando 8% de todo mercado de medicamentos. Hoje, existem mais de 7 mil estabelecimentos desse tipo de estabelecimentos no Brasil, sendo responsáveis pela produção de medicamentos em pequena escala, de forma personalizada e cercada de cuidados exigidos pelas legislações vigentes (PINTO et al., 2016). As Farmácias que manipulam medicamentos também geram resíduos potencialmente prejudiciais ao meio ambiente e considerados como

“emergente”. Estudos realizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) demonstraram que no Brasil são geradas cerca de 120 mil toneladas de lixo por dia, e que cerca de 1 a 3% desse total é produzido por estabelecimentos de saúde – incluindo as Farmácias Magistrais; sendo que cerca 10% a 25% de resíduos em saúde representam risco ao meio ambiente e a saúde da população – incluindo os medicamentos. (BRASIL, 2012).

## **1.2 Interferentes Endócrinos e sua ação como poluente emergente**

Um dos poluentes emergentes que merece atenção em especial são o Interferentes Endócrinos (IEs), como estrógenos e seus derivados. Tais compostos vêm sendo amplamente estudados, e os esforços atuais se concentram na identificação e remoção química destes hormônios. (MORAIS et al., 2018).

A avaliação da ecotoxicidade promovida pelos IEs, em especial o estrógeno e análogos, valendo-se do uso de biotestes, também vem sendo estudada devido à importância de se ter indicadores que permitam compreender melhor os impactos desses compostos no meio ambiente

Diante desta realidade, é que estudos que visem identificar os impactos no ambiente através de métodos rápidos e representativos são de suma importância, pois nos possibilitam refletir sobre seus resultados encontrados sobre estes contaminantes e promover ou estimular políticas eficientes de controle de descarte de resíduos na produção de medicamentos. Uma forma de identificar o risco de toxicidade ambiental passa pelo uso de bioindicadores, que são micro-organismos sensíveis a alterações ambientais e que podem emitir sinais de alerta ambiental.

## **1.3 Uso de biotestes para avaliação de risco ou perigo no nível trófico primário**

Dentre esses micro-organismos presentes no nível trófico primário, tem-se a *E. gracilis*. São seres que realizam atividade fotossintética, sendo este um parâmetro útil para pesquisas de ecotoxicidade, pois alterações nesta atividade pode denotar alterações que indiquem risco ou perigo ambiental. As *E. gracilis* também apresentam características definidas quanto a sua mobilidade, velocidade de movimento, orientação espacial e flexibilidade, que também são utilizados para avaliação de risco ou perigo quando se apresentam alterados frente a um dado contaminante (RIVIERS, 2006).

#### **1.4 Hormônio 17 $\beta$ estradiol e análogos: seu uso terapêutico e sua atuação como poluente emergente e seus impactos ambientais**

Um dos poluentes emergentes que desperta atenção em especial são os estrógenos e seus derivados que se encontram nas águas - principalmente o 17 $\beta$  estradiol e análogos estruturais (SOLOMON; SCHETTLER, 2000). Estes hormônios são encontrados em concentrações mínimas, o que de imediato não representa riscos à saúde e ao meio ambiente, porém a exposição crônica pode levar a feminização de peixes em rios contaminados, e o consumo de águas contaminadas compromete a saúde humana pela ocorrência de um desequilíbrio endócrino (SNYDER, 2003), que resulta em uma elevação do risco de desenvolvimento de câncer de colo uterino e de mama em mulheres, e nos homens aumenta a chance de ocorrência de câncer de próstata. (WARNING, 2005; MANIERO et al., 2008). Estes hormônios também exercem ação antioxidante nos organismos vivos devido as suas características químicas e podem assim influenciar processos metabólicos já existentes (STANCEY et al., 1996).

#### **1.5 Estratégias de remoção de 17 $\beta$ estradiol e seus análogos e a formação de Compostos Originados na Degradação (CODs)**

De maneira geral, observa-se que processos convencionais de tratamento de água apresentam escassa utilidade na remoção deste tipo de poluentes emergentes. Nos processos biológicos, por exemplo, a eficiência de degradação é fortemente influenciada pela presença de outros microconstituintes, o que faz com que a degradação dos fármacos, além de ocasional, seja apenas parcial (KOCK-SCHULMEYER et al., 2011). Sistemas fundamentados em processos de adsorção têm sido recentemente propostos, utilizando-se sorbentes clássicos (carvão ativado) e modernos (micelas pré-adsorvidas em montmorilonita), entretanto sua eficácia é discutível (CRUZ, 2010).

Um processo promissor trata-se dos Processos Oxidativos Avançados, a base de radicais redutores a base de hidroxilas altamente reativas; obtidas na presença de peróxido de hidrogênio ou pela presença de ozônio. Nestes processos tem-se a degradação – no caso do estradiol e análogos – do grupo farmacofórico que nestas moléculas corresponde a uma Hidroxila Trissubstituído Monofenólicas (HTM). Entretanto, há de se considerar que os Compostos Originados Desta Decomposição (CODs), podem também exercer algum tipo de influência e

ser compostos que denotem algum risco ou perigo ambiental, sendo necessária também a sua avaliação.

Diante do anteriormente exposto, fica a dúvida norteadora deste trabalho: Que alterações os Interferentes Endócrinos (IEs) e também os Compostos Originados de sua Degradação química (CODs) podem promover ao nível trófico primário – aqui representado pelas *E. gracilis* - que denotem risco ou perigo ambiental significativos e não conhecidos?

Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi conhecer a influência que ocorre sobre nível trófico primário não só dos IEs em estudo, mas também de seus CODs obtidos via POA a base de ozônio e luz UV, evidenciando a existência de perigo ambiental em ambas condições (IEs e CODs), estudando as alterações nas algas não somente em solução preparada em bancada, mas também em efluente de uma Farmácia Magistral, e comparar os resultados antes e após o emprego do POA a base de ozônio e ultra violeta.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Conhecer a influência que ocorre sobre nível trófico primário não só dos IEs em estudo, mas também de seus CODs obtidos via POA a base de ozônio e luz UV, evidenciando a existência de perigo ambiental em ambas condições (IEs e CODs)

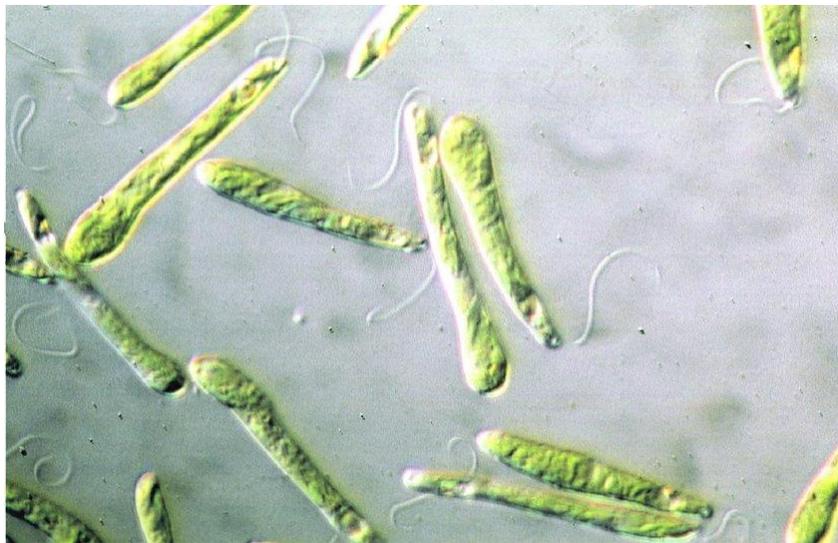
### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar o tempo em que se inicia a remoção satisfatória (>90%) do grupo farmacofórico do IE – a Hidroxila Trissubstituído Monofenólicas (HTM)
- Observar as alterações de *Comportamento das Algas (CA)*, *Concentração de Clorofila (Cclo)* e *Eficiência Global Fotossintética (EGF)* em algas do gênero *E. gracilis* – representante do nível trófico primário - frente a presença de IEs e CODs,
- Comparar as alterações de CA, Cclo e EFG entre si, para verificar a correlação entre elas e a influência de uma condição alterada sobre outra.
- Determinar quais alterações foram as mais relevantes e significativas e que apontem para risco ou perigo ambiental.
- Discutir a relevância da análise do impacto das alterações do nível trófico primário, frente a sua extensão e sensibilidade
- Discutir o uso das estratégias de POA, bem como a possibilidade de risco dos CODs formados.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

O uso de algas como indicador biológico é importante porque, como produtores primários, elas se situam na base da cadeia alimentar e qualquer alteração na dinâmica de suas comunidades pode afetar os níveis tróficos superiores do ecossistema.

Dentre as vantagens em se utilizar algas em testes de toxicidade pode-se destacar sua grande sensibilidade às alterações ocorridas no meio ambiente e o seu ciclo de vida relativamente curto, o que possibilita a observação de efeitos tóxicos em várias gerações (HÄDER et al. 2011).



**Figura 1.** *E. gracilis*.

Fonte: Häder et al. (2011).

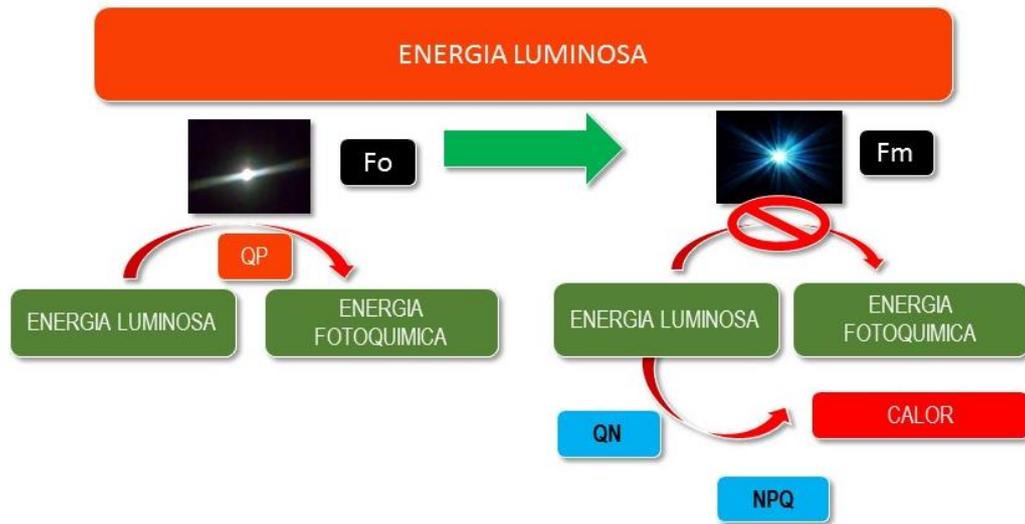
*Euglena* é um gênero de alga unicelular da divisão *Euglenozoa*, classe *Euglenophyceae*. Enumeram-se cerca de 1000 espécies, e dentre elas, destaca-se a *E. gracilis* encontrada em ambientes dulcícolas, marinhos ou de águas salobras. Não possui parede celular, reproduz-se assexuadamente e é um protista mixotrófico, ou seja, possui hábito autotrófico, produzindo açúcares através da fotossíntese ou heterotrófico, consumindo partículas alimentares por fagocitose. Representantes deste gênero possuem dois flagelos com funções distintas, utilizando o flagelo longo para orientação e movimentação.

Para observar o ambiente e procurar a melhor posição para a fotossíntese, a célula possui um estigma, uma organela primitiva localizada na base do flagelo que filtra a luz solar em função de detecção de estruturas fotossensíveis. (REVIERS, 2006).

Estas algas são seres que armazenam óleos e polissacarídeos como reserva, apresentando plastos contendo clorofila a e b e carotenos. As *E. gracilis* apresentam características definidas quanto a sua mobilidade, velocidade de movimento, orientação espacial e flexibilidade. Em ambiente propenso ao seu desenvolvimento, estas algas possuem comportamento típico sem apresentar grandes alterações. Por sua vez, quando se encontram em ambientes contaminados por alguma substância nociva, um ou mais parâmetros anteriormente citados podem apresentar-se modificados. Tal diferença de comportamento torna-se um importante indicador de ecotoxicidade aquática, sendo utilizado para este fim por diversos pesquisadores. (REVIERS, 2006).

A fotossíntese das algas é usada como parâmetro ecológico nos testes de bioensaio para monitorar qualidade da água, uma vez que responde com sensibilidade às mudanças ambientais, através de uma variedade de mecanismos que influenciam a eficiência de captação de luz. (BELSHE et al., 2007). Além disso, as alterações nos complexos proteína-pigmento, a diminuição da atividade de fotossíntese, bem como a inibição da transferência de elétrons são sintomas comuns com a exposição ao estresse. (MILES, 1990). Fotossistema II e o complexo de água-oxidante são considerados os locais alvos mais sensíveis às condições de estresse (PLEKHANOV; CHEMERIS, 2008).

Outros parâmetros úteis relacionados à atividade fotossintética são os rendimentos quânticos da fotossíntese. Quando exposto a uma energia luminosa, um nível máximo de fluorescência ( $F_m$ ) é atingido no aparelho fotossintético, ocorrendo logo em seguida o decaimento desta luminescência ( $F_o$ ), o que deixa a clorofila apta a receber novamente a energia luminosa. O rendimento da fotossíntese é medido pela diferença entre os valores de  $F_m$  e  $F_o$  em relação a  $F_m$  ( $F_m - F_o / F_m$ ). O fenômeno de redução da luminescência e a sua conversão em energia para outras finalidades são chamados de dissipação da energia de excitação. Caso a energia promova um aumento na taxa de elétrons transportados para fora do FSII, o processo envolve o metabolismo de carbono e está associado à ativação de certas enzimas destinadas para este fim. Esta dissipação da fluorescência é chamada de extinção fotoquímica (qP). Paralelo a este fenômeno, pode-se ter um aumento na eficiência na qual a energia é convertida em calor. Este processo é chamado de extinção não fotoquímica (qN e NPQ). Este último fenômeno está diretamente relacionado com fenômenos de fotoproteção (Figura 2) (MAXWELL; JOHNSON, 2000).



**Figura 2.** Mecanismo de dissipação de energia na forma de calor

Fonte: Maxwell e Johnson (2000).

Estes parâmetros são alterados em resposta a qualquer estresse ambiental, como irradiâncias baixas ou elevadas, alta temperatura, poluentes orgânicos e inorgânicos. (BOLHÀR-NORDENKAMPF; OQUIST, 1993; KRAUSE, 1988; KRAUSE; WEIS, 1991). Como resultado, torna-se um método comum para estudar a interação do ambiente com a fotossíntese das plantas, macro, bem como microalgas. (NIELSEN; NIELSEN, 2008).

Estas algas apresentam características definidas quanto a sua mobilidade, velocidade de movimento, sentido de orientação “r-value” (que indica se o conjunto de algas movimenta no mesmo sentido ou estão dispersas), fototaxia, gravitaxia (velocidade de movimento para a superfície) e mobilidade. Em ambiente propenso ao seu desenvolvimento, possuem comportamento típico sem apresentar grandes alterações. Por sua vez, quando se encontram em ambientes contaminados por alguma substância nociva, um ou mais parâmetros anteriormente citados podem apresentar-se modificados. Por exemplo, pode-se ter uma velocidade de movimento a superfície – gravitaxia - que pode indicar uma dificuldade para realizar fotossíntese por não conseguir buscar a luz. O sentido de orientação “r-value” também pode indicar que – pelos movimentos dispersos – um conjunto menor de algas chegue a superfície para buscar luz, sendo estas prejudicadas quanto a eficiência fotossintética por menor acesso a luz superficial. Tal diferença de comportamento torna-se um importante indicador de ecotoxicidade aquática. (REVIERS, 2006).

Quanto mais lenta for a velocidade de subida de uma população de algas ou sua dispersão, mais riscos pode apresentar para a sua sobrevivência, e a sua diminuição ou ausência

influenciar na quantidade de oxigênio produzido, visto que as algas são grandes produtoras de oxigênio. (PINTO et al., 2017).

Considerando então os aspectos comportamentais e energéticos das *E. gracilis*, e sua importância para análise ambiental de recursos hídricos, é que se buscou neste trabalho verificar o seu uso na identificação de risco e perigo ambiental de interferentes endócrinos (IEs) presentes em efluentes de Laboratórios que manipulam hormônios para fins terapêuticos.

### **3.1 Interferentes endócrinos: definição e sua ação no meio ambiente**

São encontrados no meio ambiente em concentrações consideradas baixas, na ordem de  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e  $\text{ng.L}^{-1}$ , e que estão representados em três classes distintas: [1] moléculas com atividade terapêutica (fármacos); [2] Interferentes Endócrinos (IE); e [3] poluentes orgânicos persistentes. Este conjunto de compostos tem despertado interesse da comunidade científica, uma vez que se tem comprovado que os mesmos podem causar efeitos adversos aos seres vivos quando expostos em longo prazo, mesmo que em concentrações abaixo do que se convencionava como tóxica. Tal explicação para o fato de concentrações subtóxicas afetarem os seres vivos se fundamenta no fato de serem moléculas lipofílicas que tendem a se bioacumular nos organismos vivos e causarem efeitos em longo prazo. (BILA; DEZOTTI, 2007).

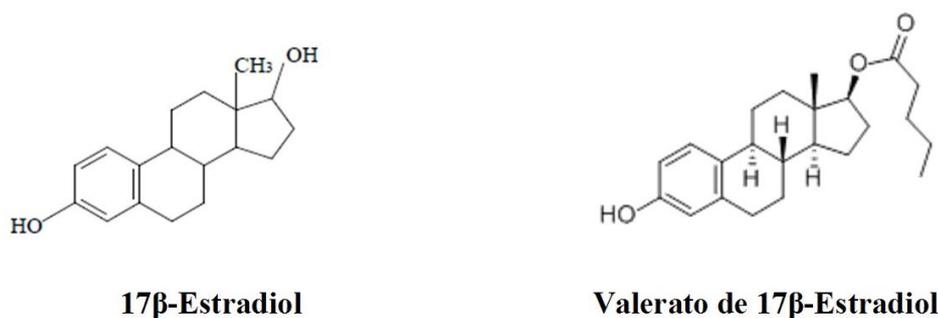
Dentre as classes de micropoluentes anteriormente citadas, tem-se os IEs. Estes são definidos como substâncias químicas exógenas, naturais ou sintéticas liberadas no meio ambiente (ALVES et al., 2007), sendo capaz de alterar o sistema endócrino por simular as ações dos hormônios naturais, estes compostos, por possuírem a capacidade de mimetizar a ação de hormônios, podem causar distúrbios que afetam a saúde humana e animal (AQUINO *et al.*, 2013); causando como exemplo: câncer de mama e de útero, aumento na incidência de ovários policísticos, redução da fertilidade masculina e câncer de próstata. (FERREIRA, 2008; LIBARDI JUNIOR, 2010).

Muitas são as substâncias que agem como IES, sendo classificadas como naturais ou sintéticas. As sintéticas abrangem pesticidas, herbicidas, dioxinas, bifenilas policloradas, alquilfenóis, ftalatos, bisfenol (FERREIRA, 2008; LIBARDI JUNIOR, 2010).

Um dos IEs presente e com forte impacto ambiental é o  $17\beta$  estradiol e seus análogos estruturais, como o  $17\alpha$  etinil estradiol e o valerato de  $17\beta$  estradiol, apresentados em detalhes a seguir.

### 3.1.1 Análogos estruturais do estradiol como interferentes endócrinos: aspectos químicos relevantes para sua ação biológica e sua interação química com receptor biológico

O hormônio 17 $\beta$ -estradiol trata-se de um estrogênio humano, responsável nas mulheres pelo processo reprodutivo, renovação óssea, controle humoral e desenvolvimento de células específicas para funções específicas (Figura 3). Sua concentração aumentada no meio ambiente advém da excreção feminina, pelo descarte inadequado de formulações terapêuticas contendo esse hormônio, efluentes de laboratórios que o manipulam e também do uso veterinário, advindo das criações animais para fins comerciais - como bovinos e suínos. A frequente utilização desse hormônio como aditivo em alimentos para bovinos faz com que o mesmo seja excretado principalmente por meio da urina. (MORAIS et al., 2018).

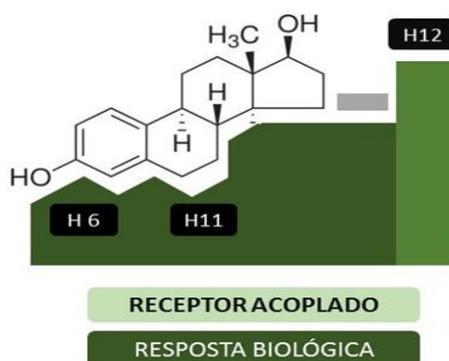


**Figura 3.** Interferentes endócrinos de caráter lipofílicos bem comercializados e manipulados em Farmácias Magistrais, e que apresentam ações deletérias ao meio ambiente.

Fonte: Desbrow et al. (1998).

Quimicamente, o estradiol apresenta estrutura 18 carbonos com uma Hidroxila Trissubstituído Monofenólica (HTM) no carbono de número 3. Existem ainda variações na posição do carbono 17, sendo que o 17 $\beta$ -estradiol apresenta uma função álcool, enquanto que o análogo valerato de 17 $\beta$ -estradiol apresenta a função éster, que tem por objetivo aumentar o tempo de meia vida deste composto (GOODMAN, 2012).

A HTM em ambas moléculas são componentes essenciais para atividade estrogênica, sendo o grupo farmacofórico desta molécula, pois é o responsável pela principal ligação química deste composto ao receptor de biológico em mamíferos do estrogênio (Figura 4), ligação esta que ocorre na hélice proteica H6 do receptor, e garante a resposta intracelular do hormônio. (LEMKE, 2012). Apresenta análogos estruturais, como por exemplo, o valerato de estradiol, estrutura acrescida de um éster para ampliação de seu tempo de meia vida.



**Figura 4.** Acoplamento do 17 $\beta$ -estradiol nas hélices proteicas, sendo a principal ligação a que ocorre em na região da hélice 6 (H6), conhecida como ligação farmacofórico.

Fonte: Desbrow et al. (1998).

O interesse na detecção de presença de compostos fenólicos, além do presente na molécula original de 17 $\beta$ -estradiol, se dá pelo fato de compostos fenólicos serem substâncias de difícil degradação biológica, podendo por este motivo levar a bioacumulação e assim interferir nas funções celulares como metabolismo, transferências intra e extracelulares de nutrientes. (OGA et al., 2008).

A exposição continuada ao fenol e seus derivados podem causar efeitos adversos a biota e causar perturbações aos ecossistemas aquáticos, principalmente em algas, ouriços e peixes devido às disfunções orgânicas. (ZAGATTO; BARTOLETTI, 2008). Por outro lado, alguns compostos fenólicos são de grande importância para os organismos vivos, pois atuam como poderosos antioxidantes que são importantes no combate aos radicais livres que podem estabelecer o estresse oxidativo ou atuando como agentes quelantes que limitam a atuação negativa de certos metais. (ADAK; PAL, 2006).

Estes hormônios também exercem ação antioxidante nos organismos vivos devido as suas características químicas já citadas, e podem assim influenciar processos metabólicos já existentes nos seres vivos. Pesquisa realizada por STANCEY (1996) procurou comparar a atividade antioxidante de 17 $\beta$ -estradiol com outros antioxidantes solúveis em lipídeos ( $\alpha$  – tocoferol e  $\beta$  – caroteno). Evidenciou-se neste estudo, que o estradiol foi tão eficaz como agente antioxidante quanto ao  $\alpha$  – tocoferol, em termos de peroxidação de ácidos graxos.

Sendo um dos poluentes emergentes que desperta atenção em especial por serem frequentemente encontrado nas águas em concentrações mínimas, o risco da exposição crônica vem sendo bastante investigado nas últimas décadas.

Dentre os efeitos mais citados tem-se a feminização de peixes em rios contaminados, e o comprometimento da saúde humana pela ocorrência de um desequilíbrio endócrino (SNYDER, 2003), que resulta em uma elevação do risco de desenvolvimento de câncer de colo uterino e de mama em mulheres, e nos homens aumenta a chance de ocorrência de câncer de próstata, entre outras doenças, conforme se observa na Tabela 1. (WARNING, 2005; MANIERO et al., 2008).

**Tabela 1.** Enfermidades causadas pelos IEs descritos na literatura.

ENFERMIDADES EM HUMANOS	REFERENCIA
Diminuição do esperma	<i>Skakkebaek et al., 1992</i>
Criptorquidismo e Hipospadias	<i>Brucker-Davis et al., 2003; Kim et al., 2005</i>
Câncer Testicular	<i>Forman et al. 1994; Huyghe et al., 2003, Amaral, 2002</i>
Câncer de Próstata	<i>Sasco., 2003;</i>
Cancer de Mama	<i>Ibarluzea et al., 2004</i>
Endometriose	<i>Amaral, 2002</i>
Endometriose	<i>Schumutzler et al; 2004</i>
Puberdade Precoce	<i>Olea et al., 2001; Teiman et al., 2002</i>

Fonte: Warning (2005) e Maniero et al. (2008).

Frente aos riscos então expostos, uma análise das fontes emissoras passíveis de controle e tratamento se faz necessário conhecer, a fim de evitar que tais hormônios cheguem ao meio ambiente e possam causar os referidos danos. A seguir então serão mostradas as principais fontes e a que foi eleita para o estudo desta pesquisa.

Juntamente com a aumento populacional ininterrupto, tem-se também o aumento da poluição antropológica per capita existente, com consideráveis danos aos meios aquáticos, em função do aporte cada vez maior de produtos químicos diversos nos recursos hídricos.

Boa parte destes contaminantes químicos até possuem regulamentação quanto a quantidade tolerável nas águas, como a CONAMA 430/1 e a portaria 357/05 da ANVISA; e em certos casos até a descrição do meio como devem ser removidos dos recursos hídricos. Entretanto, com o advento da denominada “poluição emergente”, tem-se atualmente uma categoria desprovida de regulamentações e requerendo maiores conhecimentos sobre seus impactos ambientais e na saúde humana.

Soma-se a esta questão o fato de tais produtos serem descartados no ambiente sem tratamento adequado para sua remoção e com desconhecimento da ação residual dos produtos gerados quando submetidos a algum tipo de remoção, pois as Estações de tratamento de água não se encontram adaptadas para tais remoções (DALLEGRAVE, 2012).

E dentre a fontes de emissão de IEs, algumas são passíveis de atuação enquanto outras com intervenções mais difíceis, com a questão da excreção humana que advém do uso de estrógenos para fins terapêuticos e contraceptivos.

Dentre os IEs comumente encontrados nas águas temos os estrogênios, que são naturalmente excretados pelo corpo através da urina em parte na forma inativa, mas enzimas produzidas por *Escherichia coli* transformam esses hormônios em compostos biologicamente ativos. Estes então são carregados pela rede doméstica de esgoto, e a deficiência das estações de tratamento atuais acabam por deixar contaminar todo o ambiente aquático. (REIS FILHO et al., 2006; BARONTI et al., 2000).

A Tabela 2 mostra a excreção diária de alguns derivados do estrógeno, sendo uma parcela significativa de deposição destes hormônios no meio ambiente.

**Tabela 2.** Enfermidades causadas pelos IEs descritos em literatura.

CATEGORIA	ESTRONA	17 $\beta$ ESTRADIOL	17 $\alpha$ E. ESTRADIOL
Homens	3,9*	1,6	-
Mulheres	-	-	35
Mulheres menstruando	8	3,5	-
Mulheres menopausa	4	2,3	-
Mulheres grávidas	600	259	-

\*Excreção diária ( $\mu\text{g}$ ) per capita de estrogênios

Fonte: Reis Filho et al. (2006).

Ressalta-se que outras fontes emissoras podem ser controladas e tratadas para impedir maior acúmulo destes IEs no meio ambiente, como as apresentadas a seguir.

O uso veterinário, e da excreção de metabólitos que não são eliminados no processo de tratamento de esgotos. Alguns fármacos permanecem na água potável mesmo após tratamento e purificação. Sua concentração aumentada no meio ambiente e advém tanto das criações animais para fins comerciais, como bovinos e suínos, bem como os efluentes das estações de tratamentos de esgotos domésticos. A frequente utilização desse hormônio como aditivo em alimentos para bovinos faz com que o mesmo seja excretado principalmente por meio da urina. (FERNANDES et al., 2011).

Apesar do uso veterinário apresentar uma parcela significativa, dentre as fontes controláveis e tratáveis, as advindas de estabelecimento de saúde merecem atenção especial, como os IEs advindos de Farmácias Magistrais.

As Farmácias que manipulam medicamentos, também denominadas de “Farmácias Magistrais” também geram resíduos potencialmente prejudiciais ao meio ambiente e considerados como “emergente”. Entretanto pouco se sabe do potencial de risco ou perigo que tais estabelecimentos podem provocar no meio ambiente.

Estudos realizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) demonstraram que no Brasil são geradas cerca de 120 mil toneladas de lixo por dia, e que cerca de 1% a 3% desse total é produzido por estabelecimentos de saúde – incluindo as Farmácias Magistrais; sendo que cerca 10% a 25% de resíduos em saúde representam risco ao meio ambiente e a saúde da população – incluindo os medicamentos. (BRASIL, 2012).

Na última década, as Farmácias Magistrais tiveram um total de prescrições manipuladas correspondente a aproximadamente 8% de todas as prescrições dispensadas no Brasil. (PINTO et al., 2016). No início da década de 2010 existiam mais de 7 mil estabelecimentos desse tipo espalhados pelo país, sendo este número mantido atualmente (CRFSC, 2019). Estas farmácias são responsáveis pela produção de medicamentos em pequena escala, de forma personalizada e cercada de cuidados exigidos pelas legislações vigentes, ressaltando que tais legislações não abordam questões referentes a poluição emergente e nem as estações de tratamento conseguem lidar com tal demanda, se limitando ao básico do tratamento de efluentes (ESPLUGAS, 2010).

Na cidade de Joinville – local do estudo – tem-se atualmente 25 Farmácias Magistrais registradas no Conselho de Farmácia e Vigilância Sanitária, que atuam desde o segmento tradicional - atendendo demandas de medicamentos e cosméticos - até as especializadas em produtos veterinários e manipulação de hormônios.

Considerando que a cidade de Joinville apresenta cerca de 31,5% de seus efluentes domésticos tratados (AGUAS DE JOINVILLE, 2019), e que a maioria dos Laboratórios de Farmácia Magistral estão localizadas em áreas que não possuem a captação destes efluentes pelo sistema público, todos os dejetos produzidos são jogados *in natura* e tem como destino final a Baía da Babitonga. (BREITER et al., 2004).

Nestas condições expostas, sabe-se que tais estabelecimentos são potenciais poluidores que carecem de saber ao certo o impacto que podem causar, e qual as medidas que deveriam ser tomadas para amenizar tais impactos. Este trabalho propõe realizar também uma análise de risco e perigo ambiental, investindo no estudo de bioindicadores para IEs que apresentem vantagens aos já existentes, apresentando como vantagem contar com um ser que é de fato encontrado no meio ambiente.

A avaliação da ecotoxicidade promovida pelo estrógeno, valendo-se do uso de biotestes também vem sendo estudada devido à importância de se ter indicadores que permitam haver um parecer sobre a toxicidade aguda e crônica destes hormônios nos ambientes aquáticos.

Para os casos de biotestes que avaliam a contaminação por estrógenos, utilizam-se como bioindicadores a vitelogenina (VTG) e a proteína zona radiata (ZR). Estes compostos são normalmente encontrados em peixes do gênero feminino, mas quando encontrados em peixes machos juvenis, indicam a ocorrência de desequilíbrio endócrino promovido pela presença de estrógenos no meio. (CORDEIRO, 2007). Estes biotestes, apesar de serem específicos para a contaminação estrogênica, apresentam como desvantagens a demora em obtenção da resposta, além de um elevado custo para a realização dos testes. (ARIAS, 2007). Tal método ainda requer a captura de peixes, com autorização prévia do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA), além de seguir protocolos de proteção animal, o que torna o procedimento ainda mais difícil. (AZEVEDO, 2003).

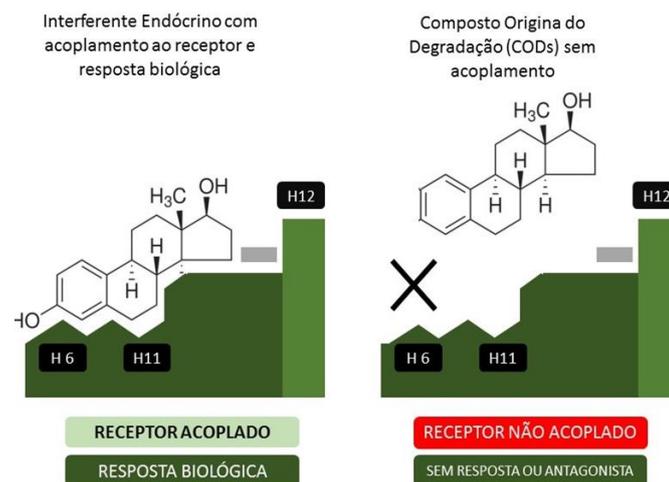
Outro teste utiliza o gene receptor de estrogênio humano integrado ao genoma de uma levedura. No seu interior ocorre a ativação do receptor pelo estrogênio, expressando o gene receptor da Lac-Z que produz a enzima  $\beta$ -galactosidase. Esta enzima é excretada no meio e metaboliza o substrato cromogênico CPRG (normalmente amarelo) em um produto vermelho, e essa mudança de coloração pode ser medida pela absorbância. (BILA, 2007). A desvantagem deste método reside no fato dos seus resultados serem limitados a uma resposta exclusivamente ligada ao receptor estrogênico e da impossibilidade de avaliar quanto à toxicidade destes ou de risco ambiental.

Considerando que exista uma necessidade de se ter biotestes mais ágeis e de fácil manuseio, o estudo de novos biotestes se torna cada vez mais importante. Por isto a proposta de biotestes específicos usando *E. gracilis* se faz necessário, e este processo precisa ser amplamente estudado, principalmente no que se refere às alterações que podem advir frente à exposição a um IE.

Entretanto, vale ressaltar que na tentativa de remoção química da atividade estrogênica, novos compostos químicos são formados, e que podem interagir com o meio ambiente também. Portanto, esses novos compostos, também chamados de Compostos Oriundos de Degradação (CODs), também devem ser objeto de estudo quanto aos impactos ambientais que podem gerar.

A Hidroxila Trissubstituída Monofenólica (HTM) dos estradióis desempenha um papel importante na atividade biológica deste composto. Uma vez removida essa porção fenólica, tem-se a remoção da atividade estrogênica (BILA; DEZOTTI, 2007) e a não ocorrência de seus efeitos nos seres vivos suscetíveis a sua ação, conforme mostra o esquema demonstrado na

figura 5, no qual mostra que a porção hélice 6 do receptor (H6) realiza uma ligação do tipo “ligação de hidrogênio” em que leva a ativação de segundo mensageiros que expressaram a resposta biológica. Uma vez suprimida a HTM, tal interação e a referida ativação do segundo mensageiro não ocorre, não havendo a resposta biológica conhecida. Contudo, pouco se sabe dos efeitos dos CODs ou das respostas biológicas diferentes das conhecidas que podem ocorrer. (PINTO et al., 2014). Com o objetivo de modernizar as estações de tratamento de água e esgoto para eliminar contaminantes emergentes, algumas técnicas são listadas em países da Europa e nos Estados Unidos, como a remoção física por membranas ou adsorção, ou então, por degradação dos IE por aplicação de Processos Oxidativos Avançados (POAs). Estes últimos se destacam por envolverem agentes oxidantes e possuem uma alta taxa de reação com os radicais OH<sup>-</sup> e os poluentes orgânicos. (MUNTER, 2001).



**Figura 5.** Remoção da hidroxila do HTM levando a não ação hormonal em células.

Fonte: Adaptado pelo autor Desbrow et al. (1998).

O uso de ozônio como agente oxidante em POAs tem-se mostrado interessante devido a sua boa capacidade de alterar o HTM farmacofórico presente na maioria dos IEs derivados do estradiol. Seu processo envolve tempos curtos de alteração da hidroxila fenólica quando comparado com os outros, reduzindo muito seu custo de operação. O uso combinado com luz ultravioleta torna o processo ainda mais eficiente, diminuindo em até 22,5% no uso do ozônio.

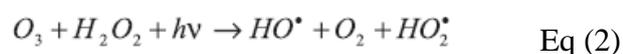
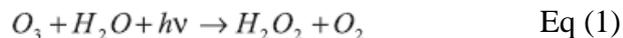
A eficiência pode ainda ser incrementada se o pH envolvido no processo de alteração molecular for em torno de 3,0. Porém, a correção do pH para valores próximos de 3,0 representa mais uma etapa que pode tornar o processo mais dispendioso do que uma mesma remoção realizada em pH próximo de 7,0 – valor encontrado na maioria dos efluentes estudados.

(IRMAK et al., 2005). Sendo assim estudos nos dois pHs vem sendo realizados avaliando a questão da eficiência, praticidade e tempo de remoção da HTM, mas o pH 7,0 acaba levando vantagem por ter um manuseio mais fácil neste processo. (BILA, 2012)

Boa parte dos estudos que visam gerar reações que degradam uma molécula orgânica contaminante, objetivando principalmente à remoção do grupo farmacofórico desta molécula (LOPEZ-SERNA et al., 2012), focando-se basicamente na alteração química do composto de origem e a supressão de sua atividade biológica conhecida. (BILA; DEZOTTI, 2003).

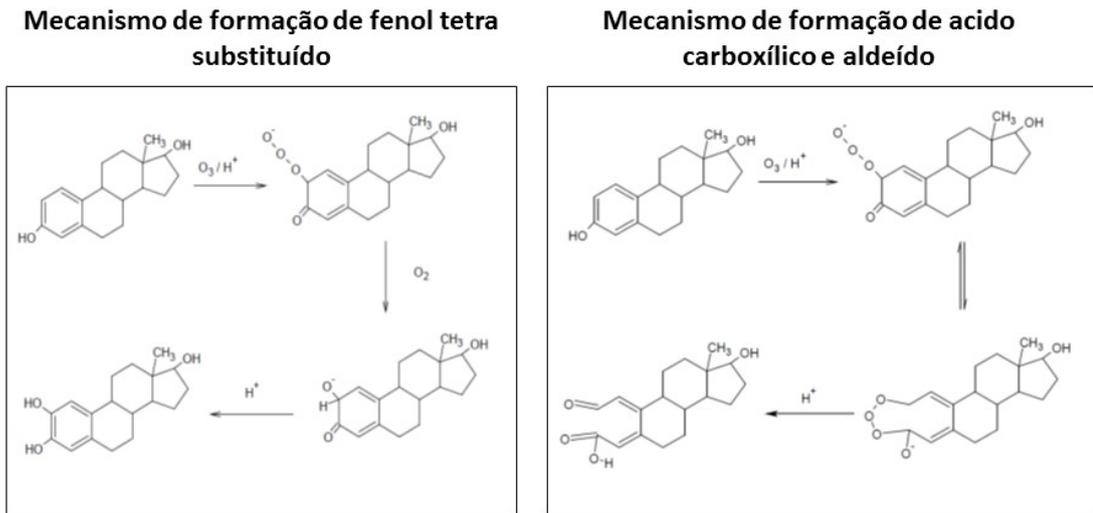
Uma técnica empregada para a remoção de poluentes emergentes de características orgânicas se baseia no desenvolvimento de Processos Oxidativos Avançados (POA), que correspondem a uma forma de tratamento de recursos hídricos.

Esse processo promove a formação de radicais hidroxila ( $\text{HO}\cdot$ ) altamente reativos e pouco seletivos. A formação se dá por irradiação do ozônio (Figura 6); podendo atuar na oxidação química de uma vasta gama de substâncias orgânicas - como medicamentos - transformando-os em outras substâncias que a priori não apresentam as mesmas interações biológicas que a molécula original. (SANTOS et al., 2010).

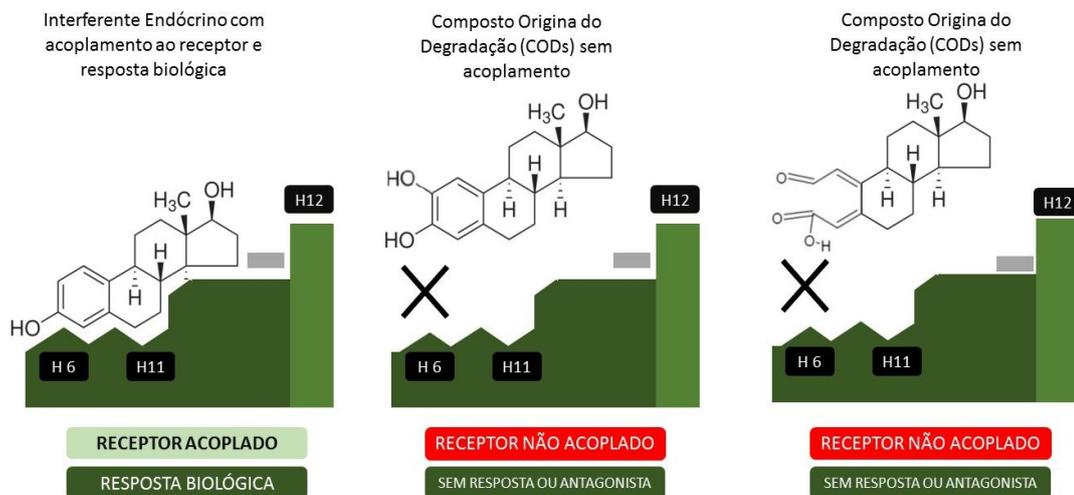


**Figura 6.** Processo de formação da hidroxila altamente reativa.

Pelo ataque do radical hidroxila ( $\text{HO}\cdot$ ) se iniciam complexas reações em cascata no grupo farmacofórico do estradiol, que podem levar a sua mineralização, como aponta a Figura 7, sendo possível a formação de outros compostos, aqui denominados como CODs, que não interagiriam com os receptores estrogênicos, conforme mostra Figura 8. (DALMÁZIO, 2007).



**Figura 7.** Prováveis mecanismos de formação de CODs mais complexos que não apresentam atividade estrogênica. No processo a esquerda tem se a formação de um fenol tetrassubstituído, enquanto que no mecanismo a direita a abertura do anel com formação de ácido carboxílico e aldeído.



**Figura 8.** Intermediários já identificados. Em pH 7,0 encontra-se a maior parte dos CODs conhecidos.

Uma forma de obter a oxidação avançada é a base de ozônio, técnica bastante utilizada em conjunto com outros agentes oxidantes, como peróxido de hidrogênio, dióxido de titânio e a presença de luz ultravioleta. Estes processos que vem se mostrando bastantes eficazes na descontaminação ambiental emergente. (SHI, 2010).

Diversas são as formas de se obter tais Radicais Hidroxilas altamente reativos nos POAs, variando do uso de compostos inorgânicos ao uso de radiação ou luz ultravioleta para

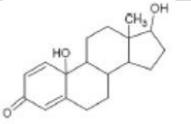
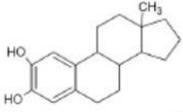
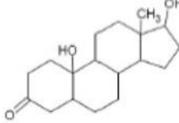
incrementar o processo. (DOMÈNECH et al., 2004). A escolha do processo mais adequado recai sobre a estabilidade do composto e a mensuração do risco ambiental residual que pode ocorrer.

Desta maneira, a opção por agentes oxidantes como O<sub>3</sub> e peróxido de hidrogênio, associado a luz ultravioleta, vem merecendo destaque pela eficiência que apresenta e pelo baixo dano ambiental que podem eles causar, pois os compostos formados podem variar de moléculas com certo grau de complexidade até compostos menores variados. (MILLS et al., 2015).

Estudos conduzidos por PINTO et al. (2014) demonstraram que os resíduos formados a partir de um POA a base de peróxido de hidrogênio levou a formação de intermediários que afetaram o comportamento de algas do gênero *E. gracilis*; apontando para prováveis riscos ambientais, sendo necessária a realização de outros testes de ecotoxicidade crônica em níveis tróficos diferentes (PINTO et al., 2014).

Um processo bastante promissor na remoção envolve o uso combinado de ozônio e luz ultravioleta. A remoção de 17β-Estradiol e análogos pode implicar em uma possível variação da atividade estrogênica, e a formação de subprodutos que podem ter ações sobre os micro-organismos e influenciar no ecossistema aquático e no meio ambiente. Sendo assim, é de suma importância também conhecer os impactos ambientais que os CODs podem causar (PINTO et al., 2014)..

Sabe-se que a degradação de compostos orgânicos como os IEs gera outros compostos químicos. No caso dos IEs, há o risco desses produtos de remoção ainda possuírem ação estrógena (FERREIRA, 2008), ou possuírem alguma ação de impacto ambiental ou à saúde, visto que um dos prováveis compostos encontrados pós POA é o 4 – hidroxí – estradiol, o qual não apresenta atividade estrogênica por ser um composto difenólico. Outros compostos podem apresentar características difenólicas além de outras. Ressalta-se nestes casos, que a supressão da atividade estrogênicas é suprimida, mas outros efeitos podem ocorrer nos seres vivos. (BILA, 2005). Compostos com função cetônica podem ainda com o tempo serem convertido em ácidos carboxílicos, sendo estes classificados como “compostos menores” segundo a Figura 9.

INTERMEDIÁRIO	ESTRUTURA QUÍMICA	SOLUÇÃO AQUOSA	
		pH 3,0	pH 7,0
17 β DIHIDROXI 1,4 ESTRADIENO 3 ONE		Não detectado	Presente
2 HIDROX ESTRADIOL		Não detectado	Presente
TESTOSTERONA		Presente	Presente
COMPOSTOS MENORES		Presente	Presente

**Figura 9.** Prováveis CODs formados, com presença de moléculas conhecidas e compostos orgânicos de menor número de carbonos .

O emprego de POAs nesse caso se justifica pelas questões anteriormente apresentadas envolvendo a necessidade de redução do perigo. A avaliação do impacto ambiental causado pelos resíduos formados pós POA com avaliação do perigo de toxicidade em níveis tróficos diferenciados podem dar uma dimensão mais clara do emprego deste procedimento de descontaminação e quanto aos seus resultados quanto à supressão de um dado perigo ambiental.

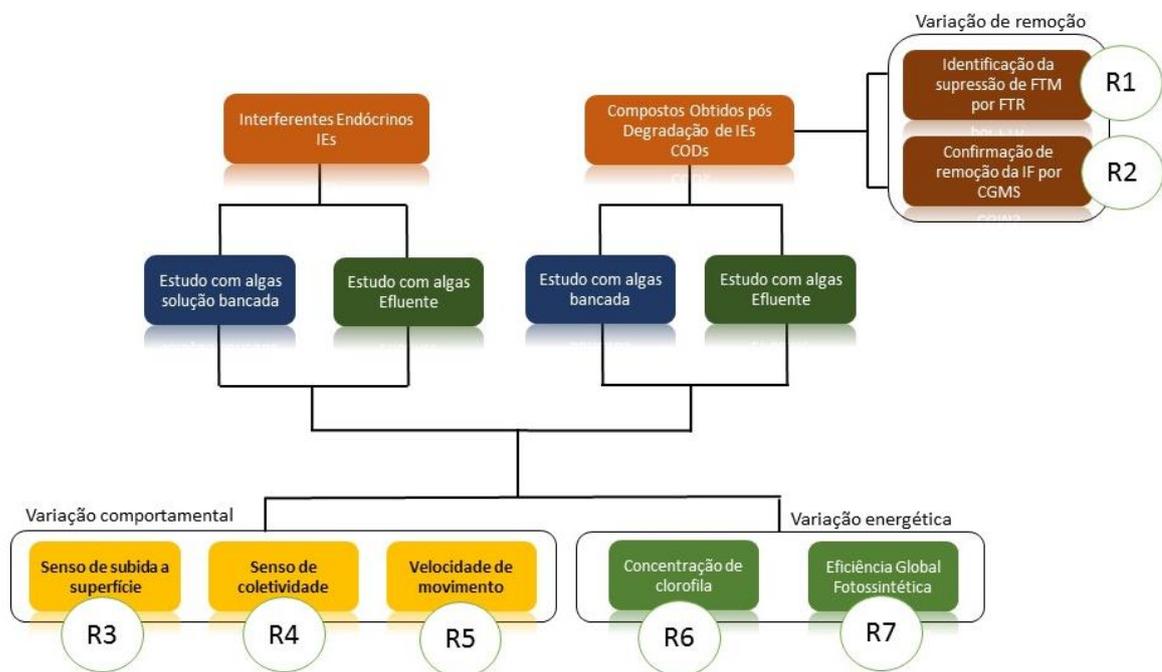
Ressalta-se também o risco de formação de outros compostos fenólicos (DALMÁZIO, 2007) que podem ser nocivos ao meio ambiente, visto que diversos estudos apontam para o comprometimento das atividades de diversos seres vivos a exposição de compostos fenólicos encontrados em diferentes ambientes aquáticos. (AYANDA et al., 2016).

Diante das situações expostas referentes aos IEs e de seus processos de remoção, e considerando as Farmácias Magistrais como potenciais fontes de contaminação, é que este trabalho propôs então realizar esta pesquisa, a fim de conhecer melhor esse universo e propor alternativas aos problemas que sejam encontrados durante seu desenvolvimento.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Esquema Geral das Análises

O desenho do estudo desta pesquisa seguiu as etapas descritas na Figura 10, no qual testes de bancadas e testes com efluentes foram realizados para efeito de comparação e controle. Todas as etapas envolvidas estão descritas a seguir.



**Figura 10.** Esquema geral do estudo, considerando o estudo de IE preparado em bancada, para servir de parâmetro para a análise dos efluentes, e as variáveis em estudo; comportamental; e energética.

### 4.2 Delineamento do estudo

Este estudo foi realizado no Laboratório de Fotoquímica e Fotobiologia e no Laboratório de Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville. Tratou-se de um estudo experimental, envolvendo o uso de algas do gênero *E. gracilis* KLEBS obtidas da coleção da Universidade de Gottingen, Alemanha. Em relação às algas, foram avaliadas as alterações comportamentais e a atividade fotossintética e alteração na concentração de clorofila, quando submetidas ao contato com água previamente contaminada com  $17\beta$ -estradiol e valerato de  $17\beta$ -

estradiol (para efeito de controle) e de água de acesso da farmácia (coletadas nas torneiras), bem como com os efluentes brutos e tratados pós POA ozônio/UV contendo 17β-estradiol e valerato de 17β-estradiol.

### 4.3 Preparo das soluções padrão controle e coleta dos efluentes

#### 4.3.1 Solução Padrão para Controle - SPC

A Solução Padrão para Controle (SPC) foi obtida a partir do padrão de e 17β-etinilestradiol, do Laboratório Sigma – Aldrich®. Devido à baixa solubilidade de 17β-estradiol em água, e a necessidade de se ter uma fonte de carbono que servisse de parâmetro para os testes, as soluções estoque foram preparadas utilizando-se acetona como co-solvente em pequeno volume, tendo-se como volume final 2 litros de solução estoque de cada hormônio. A concentração final será de 0,001 mg/mL de hormônio sendo estocadas a 4°C.

#### 4.3.2 Aspectos relativos ao local da coleta

##### 4.3.2.1 Estimativa de produção dos laboratórios da Farmácia Magistral

Para a realização do estudo contou-se com a colaboração de uma Farmácia Magistral da cidade de Joinville, norte de Santa Catarina, que permitiu a coleta das amostras dos quatro ambientes de produção da farmácia.

Um fator importante a se considerar no estudo seria a quantidade de produção e sua relação com o que é despejado nas pias e que compõe o efluente bruto dos laboratórios. Para tal, considerou-se a produção média mensal de seis meses da farmácia, efetuou-se o cálculo da Média Mensal de Produção (MMP); a fim de verificar qual a média de atividade dos laboratórios. Tal cálculo foi feito pela *Equação 1*:

$$MMP = \left( \frac{\sum \text{Quantidade pedidos mensal}}{30} \right) \times \left( \frac{\sum \text{mg de pedidos feitos}}{\text{número de pedidos}} \right) \quad (1)$$

#### 4.3.2.2 Coleta de efluentes do laboratório de hormônios e demais laboratórios

Para análise do efluente (EF) teve-se três Tipos de Amostras (TA): [1] Água de acesso: coletada da torneira dos laboratórios, para controle; [2] Efluente bruto, coletado nos sifões de cada laboratório da Farmácia, incluindo o de manipulação de hormônios, e [3] Efluente bruto coletado em “2”, porém tratado com POA ozônio/UV.

Os TAs foram coletados do [1] “Laboratório de Manipulação de Hormônios” (LMH), responsáveis pelas manipulações de formulações restritamente hormonais e objeto deste estudo; e dos demais laboratórios, estudados para efeito de controle e comparação: o [2] “Laboratório de Psicotrópicos”, responsável pela manipulação de medicamentos classificados pela Portaria 344/98 de venda controlada; o [3] “Laboratório de Sólidos”, responsável pela produção dos encapsulados e das demais formulações sólidas e o [4] “Laboratório de Dermato”, responsável pela produção das formulações sólidas e semissólidas de propriedades dermatológicas.

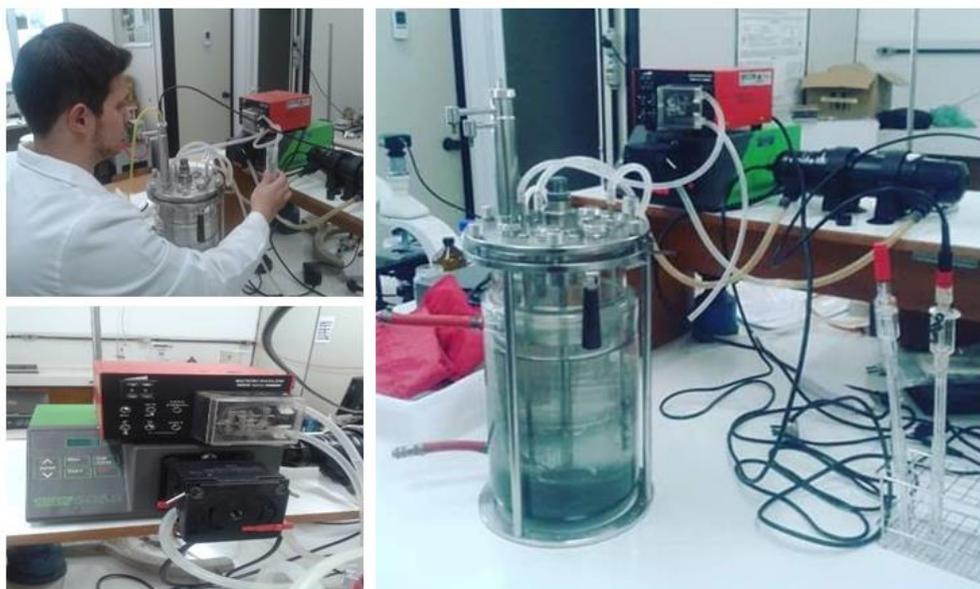
As amostras tomadas como “água de acesso” foram coletadas diretamente das torneiras das pias destinadas à lavagem do material de cada laboratório, utilizando frascos de vidro borossilicato previamente esterilizados – as quais foram utilizadas como “controle” (águas oriundas da estação de tratamento). Amostras tomadas como “efluentes brutos” foram coletadas dos sifões ligados às pias de lavagem dos materiais por meio de uma bomba peristáltica. Nesta coleta também foram utilizados frascos de borossilicato esterilizados. Foram retiradas amostras até o volume de 12 L por laboratório. Após as coletas, as amostras foram guardadas em caixas de isopor com gelo e ao abrigo da luz até seu acondicionamento em freezer no Laboratório de Fotoquímica e Fotobiologia.

#### 4.3.3 Ajuste de pH

A SPC e os EFs de cada laboratório tiveram ajuste de pH, obtendo-se frações com pH igual a 7,0 – tratadas com NaOH 1M. Tais condições visam seguir as recomendações feitas por Ferreira (2008), que desenvolveu um método de processo oxidativo avançado a base de ozônio e luz ultravioleta (O<sub>3</sub>/UV), utilizou e comparou os resultados de pHs e apontou facilidades na obtenção de uma solução no pH 7,0; encontrando resultados satisfatórios sem a necessidade de ajuste do pH, atividade essa que implica em tempo necessário para atingir o valor desejado e custos envolvendo reagentes para tal finalidade.

#### 4.4 Processo de remoção dos IEs via O<sub>3</sub>/UV e coleta nos tempos para estudos

A reação de degradação de IEs, tanto da SPC como dos EFs do LMH e demais laboratórios ocorreram – cada um a seu tempo - dentro de um reator de 5 litros. Uma bomba peristáltica promoveu de forma contínua a passagem do líquido pela luz UV acoplada, da marca Hoppas – Modelo UV 611; e através de um gerador de ozônio da marca Trump TCB, onde o gás ozônio foi injetado com vazão de 10.0 mg.L<sup>-1</sup>. (BILA et al., 2008). O pH de cada teste de remoção foi mantido com medição feita por um pHâmetro da marca Ghaka PG 2000 (Figura 11). O pH da solução foi mantido num valor de 6,0 a 7,0, sendo esta faixa a normalmente encontrada nos recursos hídricos e ser a menos dispendiosa por não requerer muitos gastos com reagentes para ajuste de pH. (BILA et al., 2012).



**Figura 11.** Esquema de remoção dos IEs no Laboratório de Fotoquímica e Fotobiologia.

Fonte: o autor.

O tempo total de degradação em todas as situações testadas foi de duas horas conforme recomendado por Ferreira et al. (2008). Primeiramente foi realizada a remoção de IESs da SPC, no qual foram retiradas amostras de 30mL no tempo zero ( $t_0$ ) para efeito de controle, e nos tempos de 90 minutos ( $t_{90}$ ), 100 ( $t_{100}$ ), 110 ( $t_{110}$ ) e 120 minutos ( $t_{120}$ ), por serem esses os tempos onde se inicia a remoção das Hidroxilas Trissubstituída Monofenólicas (HTM), que correspondem ao grupo farmacofórico (LANGSCH; PINTO 2016), objetivando assim definir – no sistema do reator – qual seria o tempo correspondente a 100% de remoção de HTM, bem

como maior concentração de Compostos Originados da Degradação (CODs). A quantidade de ozônio residual também foi avaliada utilizando gotas de permanganato de potássio a alíquotas retiradas das amostras, conforme recomenda Pires et al. (2008); no qual a mudança de cor indicava presença do ozônio residual, a fim de verificar possíveis interferências nos testes de ecotoxicidade. Em todos os testes não foi detectado ozônio residual verificado pela permanência da cor característica do Permanganato de potássio. Já nos estudos de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e estudos dos EFs, a alíquota coletada e/ou analisadas foram apenas no tempo determinado pelo experimento em SPC como sendo ausência de 100% de HTM. Ressalta-se que, o volume retirado seguiu o recomendado de ser no máximo 10% do volume total (500 mL) para não haver interferências relativas a maior exposição dos agentes oxidantes frente a um volume menor de contaminante. (ERZINGER, 1986). Logo após as coletas as amostras foram guardadas em freezer para posteriores análises.

#### **4.5 Avaliação da percentagem de remoção do grupo farmacofórico (HTM)**

As remoções do grupo farmacofórico, aqui correspondente as HTMs nos tempos estipulados foram analisadas por espectrometria de absorção UV na faixa de 203 – 280 nm, a fim de avaliar em que tempo não haveria mais detecção do anel fenólico e a presença de estrógeno residual após o POA - O<sub>3</sub>/UV, conforme a avaliação do pico de hidroxilas. (BILA, 2012). A porcentagem de hidroxilas monofenólicas foi calculada pela *Equação 2*:

$$\%HTM = \left[ \frac{(1-abs\ referencia-abs\ amostra)}{abs\ refência} \right] \times 100 \quad (2)$$

#### **4.6 Confirmação remoção de 17β-estradiol e valerato de estradiol via CGMS nos tempos apontados no UV**

Para a detecção da presença ou não de 17β-estradiol e de sua forma valerato de estradiol nos tempos em estudo, foi realizada a extração da fase orgânica, usando acetona, conforme Araújo (2010), para posterior análise em CG-MS da marca Agilent modelo 7890A, obedecendo as condições propostas por Pires (2008). A coluna utilizada no CG-MS foi a HP-5MS, com 0,250 mm de diâmetro da marca Agilent.

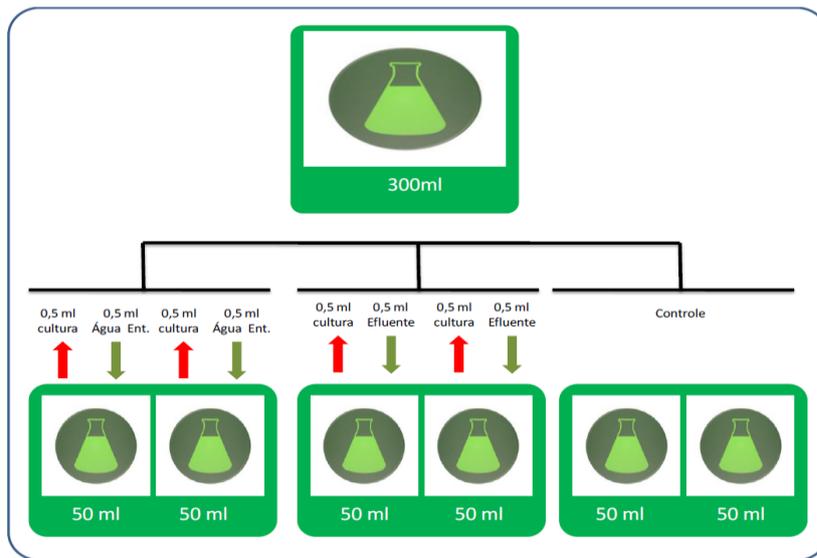
#### **4.7 Análise com espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier - FTIR**

Investigou-se também os possíveis compostos formados após o POA e possíveis interferências quanto ao comportamento da alga em estudo (*E. gracilis*), realizando então os cromatogramas para verificar a presença de compostos que pudessem trazer informações sobre as mudanças na atividade fotossintética antes e após o processo de ozonização. As análises de FTIR foram realizadas em um equipamento da PerkinElmer (disponível na Universidade da Região de Joinville), utilizando o método de Reflexão Total Atenuada (ATR), de 4.000 a 600 cm<sup>-1</sup>, com 32 varreduras. Por serem líquidas, as amostras foram prensadas entre duas placas de um sal de alta pureza como o cloreto de sódio.

#### **4.8 Estudos sobre a influência dos IEs e CODs sobre o nível trófico primários, usando *E. gracilis* como marcador de risco**

##### **4.8.1 Preparo das Culturas Testes (CT) de *E. gracilis* para o contato com as amostras em estudo**

Foram consideradas 11 Culturas Testes (CT), contendo 50 mL de algas que foram submetidas a algum composto: [1] SPC com IEs, [2] SPC com CODs, [3] EF do laboratório de hormônios com IEs, [4] EF do laboratório de hormônios com CODs e [5] água de acesso coletada pela torneira. Também foi coletado EF de outros laboratórios, visando a comparação com os resultados a serem encontrados no Laboratório de Hormônios, sendo estes efluentes também submetidos a POA e gerando seus respectivos CODs. Os laboratórios com seus efluentes brutos e com CODs foram: psicotrópico [5] bruto [6] pós POA, sólidos [7] e [8]; dermatologia [9] e [10]. Uma cultura contendo apenas algas também foi considerada [11]. Todos os testes foram feitos em triplicata.



**Figura 12.** Esquema ilustrativo do preparo das culturas, retirando alíquota da cultura e adição da amostra a ser estudada.

De cada uma das 11 CTs contendo 50 mL de algas, foi retirada uma alíquota de 0,5 mL, sendo em seguida adicionado 0,5 mL da amostra (efluente ou efluente tratado com POA), conforme demonstra a Figura 12 (esquema ilustrativo). Após o prazo de uma semana, como recomendado por Ekelund (2008), as análises comportamentais e de parâmetros energéticos foram realizadas, sendo as mesmas descritas a seguir.

#### 4.8.2 Teste de avaliação de alterações comportamentais das algas pelo biomonitoramento via NG TOX

Os experimentos comportamentais com *E. gracilis* na presença de hormônios foram realizados utilizando uma ferramenta de biomonitoramento em tempo real chamada NG-TOX, desenvolvida e homologada pela Ecobabitonga Tecnologia Ltda. A ferramenta monitorou, através de análise de imagem em tempo real, o comportamento das algas, usando diferentes parâmetros de movimento flagelado unicelular fotossintetizante. (ERZINGER, CIAMPO; HÄDER, 2011).

O equipamento é constituído por um sistema de conexões envolvendo quatro tubos de silicone responsáveis pela sucção da: (1) cultura de células de *E. gracilis*; (2) amostra de águas contendo hormônios para o teste; (3) água para diluição das amostras; e (4) descarte do material analisado. Três bombas acionadas por motores de passo peristáltico transportam as células, o diluente e a amostra até uma cubeta de vidro de 22 mm de diâmetro interno e 0,2 mm de

espessura. Os organismos teste, em contato com o diluente foram homogeneizados e enviados para uma cubeta de observação, conectada a um microscópio, que capturou as imagens das células em movimento, conforme demonstra a figura 10.



**Figura 13.** Esquema de funcionamento do NG TOX.

Fonte: o autor.

As imagens foram gravadas por uma câmera Charged Coupled Device (CCD) e digitalizadas por uma placa conectada a um microcomputador, onde foram apresentadas em um monitor. O *software* então calculou os parâmetros de movimento, velocidade de locomoção, velocidade de subida a superfície, tamanho médio das células; entre outros parâmetros. Em seguida foi feita a adição das amostras e após um período de 10 minutos foi refeita a análise dos parâmetros pelo *software*. As alterações nos movimentos, velocidades médias, velocidades de subida a superfície e tamanho celular foram calculadas e comparadas com o resultado do controle e verificado as alterações que os contaminantes promoveram nas algas. (HADER, 2012).

### 4.8.3 Teste de alterações energéticas: eficiência fotossintética e de eficiência global fotossintética

Os testes de eficiência fotossintética e de eficiência fotossintética global foram realizados com o objetivo de verificar as alterações comportamentais que ocorreram. Tais parâmetros foram medidos através de um fluorímetro de amplitude de pulso modulada WATER-PAM, Walz, Effeltrich, Alemanha. O princípio de medição do PAM é baseado em mudanças no nível de fluorescência da clorofila, após a aplicação de pulsos de luz saturada. O rendimento de fotossíntese (Yeld) foi calculado, levando-se em consideração a Fluorescência Mínima ( $f_0$ ) e sua relação com a Fluorescência Máxima ( $f_m$ ), conforme equação 3:

$$Yeld = \frac{f_m - f_0}{f_0} \quad (3)$$

As culturas de algas testadas foram adaptadas no escuro por 1 hora, sendo que em seguida foram retirados cerca de 5 mL e transferidos para cubeta do equipamento PAM. Foi então submetida à emissão dos pulsos de luz saturante para avaliação da atividade fotossintética. A emissão de um pulso de luz saturante permitiu detectar a fluorescência máxima  $f_m$ , indicando redução completa do receptor de elétrons FSII. A Luz-resposta das curvas foi determinada para todas as amostras tratadas. As algas foram expostas a intensidade da iluminação crescente (gerado por uma lâmpada halógena interna) em 10 passos de 0 a 3111 molm<sup>-2</sup>/s. Após 20s de cada etapa de iluminação, um pulso saturante foi aplicado e o rendimento fotossintético e a Taxa de Transporte de Elétrons (ETR) foram medidos automaticamente.

Após os cálculos dos rendimentos fotossintéticos (Yeld), calculou-se o rendimento médio na situação testes, levando-se em conta todos os valores obtidos no processo de saturação. A Eficiência fotossintética global (EGF) foi calculada segundo equação (3) proposta por Ekelud (2008):

$$EGF = \left( \frac{\sum Yeld \text{ durante saturação}}{\text{Número de pulsos irradiantes submetidos}} \right) \times 100 \quad (4)$$

#### 4.8.4 Teste de alterações energéticas: Teste de variação da concentração de clorofila

Este teste objetivou verificar se os parâmetros analisados anteriormente também afetariam a concentração de clorofila presente. Foram retirados ao final do tempo de exposição aos contaminantes 5 mL dos meios de cultura submetidos a presença das amostras testes e do controle. Tais alíquotas foram tratadas segundo os procedimentos realizados por OSAFUNE SUMIDA (2006) e SUMIDA et al. (2007). As alíquotas foram filtradas a vácuo utilizando papel-filtro da marca Whatman® 47 mm. Os papéis contendo o filtrado (células precipitadas) foram então transferidos para um tubo falcon e receberam um volume de 5 mL de etanol, sendo posteriormente mantidos a 40°C por 60 minutos para a extração dos pigmentos que continham clorofila. As misturas foram centrifugadas a 6.000 g por 10 min a 4 °C para se agregar às células detritos. O espectro de absorbância do sobrenadante foi medido e a concentração de clorofila calculada segundo método proposto por Porra et al. (2008).

#### 4.9 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas, foram consideradas as variáveis e hipóteses apresentadas nas figuras 14,15,16,17:



**Figura 14.** Avaliação da influência da remoção de HTMs, sobre a concentração de clorofila e eficiência global fotossintética.



**Figura 15.** Avaliação da influência da remoção de HTMs, sobre os comportamentos das algas nas condições testadas.



**Figura 16.** Avaliação da influência das modificações comportamentais frente as variáveis energéticas.



**Figura 17.** Avaliação da alteração da concentração de clorofila e eficiência global fotossintética.

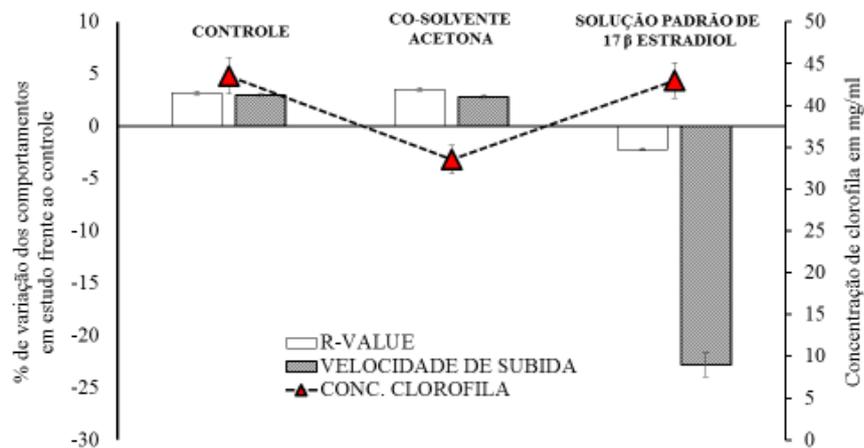
As análises estatísticas do comportamento das algas avaliadas no NG-TOX, será realizada pelo *software* ImagingTox ®. Trata-se de um programa especialmente desenvolvido e escrito em plataforma Microsoft. Net 64-bit multilíngue e banco de dados MS SQL Server. Possui sete *threads* (sendo uma principal, três para vídeo, 1 e três para vídeo 2), dois serviços (um para controle de conexão PC e NG-TOX, e um de conexão e validação com o banco de dados), permitindo armazenamento de bioensaios, realizados para “análise forense” e tela de exibição de resultados em tempo real. O ImagingTox ® realizará análise estatística 5-PL integrada.

Para a análise entre os grupos, comparando todos os efeitos, a técnica utilizada foi uma extensão da ANOVA, denominada ANOVA para medidas repetidas, que consiste em uma abordagem bem mais elaborada para dados pareados. Essa parte consta, portanto, das comparações de opiniões e médias com base nos itens quantitativos da amostragem.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise das alterações comportamentais e energéticas das algas *E. gracilis* frente ao IE padrão preparado em solução estoque: Teste em solução padrão controle – SPC

Na figura 18 estão apresentados dados referentes ao hormônio  $17\beta$ -estradiol, no qual se verificou a inibição dos parâmetros r-value e velocidade de subida a superfície (gravitaxia) quando comparado com as demais condições. Estas condições comportamentais alteradas - inibição da velocidade de subida e/ou gravitaxia - podem servir como um indicador de perigo de toxicidade, pois podem indicar que o metabolismo em geral pode estar sendo afetado por dificuldade da alga *E. gracilis* obter energia por não conseguir chegar a superfície e aproveitar adequadamente a luz para a fotossíntese. (HADER, 1985). Nos experimentos realizados, nota-se que a “inibição da velocidade de subida – gravitaxia” foi presente no experimento que continham o IE de referência junto com traços do co-solvente acetona, diferente do experimento controle (contendo apenas algas) e do experimento contendo algas expostas apenas traços de acetona. (Figura 18)



**Figura 18.** Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk) ( $P < 0,050$ ).  $H = 17,461$  com 5 graus de liberdade. ( $P = 0,004$ ). As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado por acaso; existe uma diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,004$ ).

Tal inibição é devido a estrutura química dos hormônios serem mais complexas e de difícil utilidade como fonte de carbono, necessitando de etapas de metabolização até a sua utilização como tal fonte. Outro aspecto a considerar é a lipofília dos compostos estrogênicos,

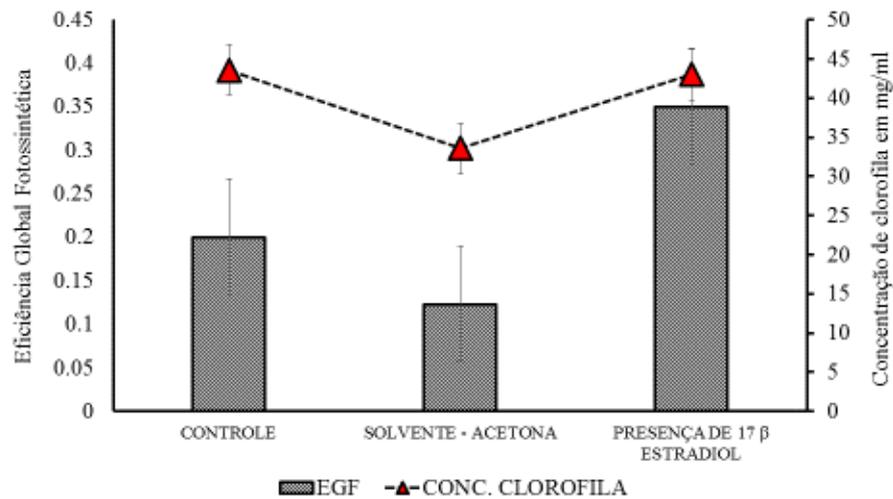
que uma vez armazenados podem dificultar a locomoção das células, primeiro pelo volume que ocupam, e segundo pelo fato de não serem as melhores fontes e estarem ocupando um lugar de uma fonte de carbono mais ideal ao metabolismo celular da alga.

Tal observação se suporta pelos resultados obtidos na exposição das algas frente a  $17\beta$ -estradiol, mais lipofílico e que apresentou maior inibição. Uma outra hipótese levantada foi referente a fluidez do meio estar alterada o que dificultaria a movimentação das algas, mas foi rejeitada pelo fato do parâmetro “mobilidade das algas”- que avalia a velocidade geral das algas – não apresentar alterações significativas, sendo a gravitaxia alterada por ser um movimento contra gravitacional. Todas as condições citadas podem também ser a explicação para a alteração de r-value, pois estando afetadas pelos compostos lipofílicos e necessitando metaboliza-los, poderiam em tempos diferentes terem movimentos de subida a superfície diferenciados comprometendo o senso de coletividade das algas. (AZIZ, 2017).

Uma vez constatada a alteração na gravitaxia e no r-value, postulou-se a hipótese de a eficiência fotossintética estar comprometida, para isso fez-se estudos sobre a concentração de clorofila (Cclo) e eficiência global fotossintética (EGF); representantes dos aspectos energéticos da fisiologia da alga.

#### **5.1.1.1 Influência atividade energética: alteração na concentração de clorofila a**

Na condição testada envolvendo o uso isolado do co-solvente acetona para análise de sua influência sobre a concentração de clorofila, foi observado um decréscimo na concentração deste composto em relação ao controle e a condição de exposição ao hormônio, após 21 dias de tratamento. Na cultura contendo  $17\beta$ -estradiol, não se observou diferença significativa entre os valores de concentração de clorofila desta condição com o controle (Figura 19), indicando que de alguma maneira o IE protegeria a clorofila, pois na solução continha traços de acetona usados como co-solvente, sendo esperado um decréscimo na concentração. (FUJITA, 2008).

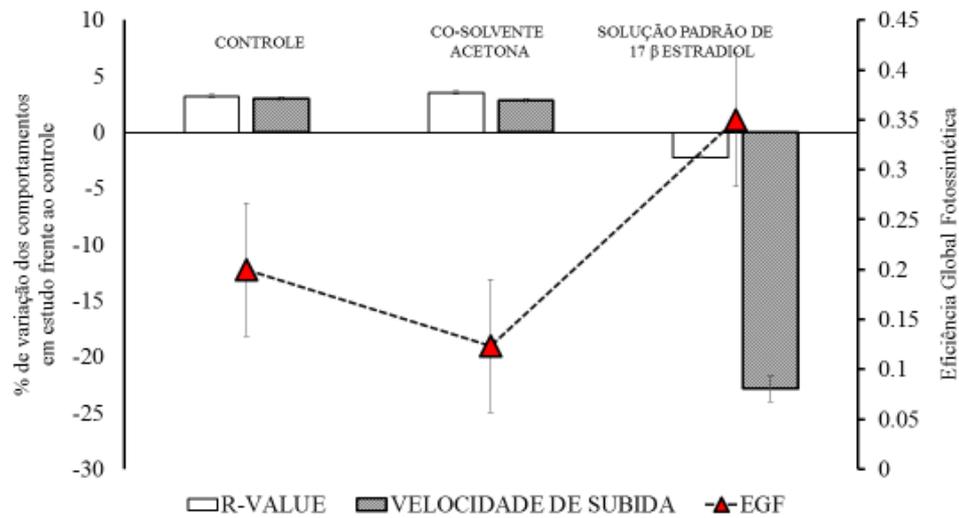


**Figura 19.** Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk) ( $P < 0,050$ ).  $H = 17,461$  com 5 graus de liberdade. ( $P = 0,004$ ). As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado por acaso; existe uma diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,004$ ).

Uma explicação plausível para tal fenômeno de “anulação” do efeito da acetona seria a ação antioxidante deste hormônio, o que levou a uma proteção e preservação das clorofilas presentes e uma menor degradação das mesmas. Este fenômeno antioxidante já havia sido descrito por STANCEY (1996), sendo suas propriedades evidenciadas neste experimento.

Uma vez constatado que não existia alteração na concentração de clorofila a, restava saber se a fotossíntese em si sofria alguma afetação principalmente das alterações comportamentais detectadas.

Com intuito de avaliar que as alterações ocorridas não se davam apenas devido à questão de fluidez, a análise da Eficiência Global Fotossintética (EGF) foi realizada. Nota-se que neste teste, a EGF no período de estudo – correspondente a 21 dias - o hormônio 17β-estradiol apresentou um valor de EGF superior aos meios exposto apenas à acetona (realizado para verificar a influência isolada deste solvente) e ao controle, conforme consta na figura 20:



**Figura 20.** Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk) ( $P < 0,050$ ).  $H = 17,461$  com 5 graus de liberdade. ( $P = 0,004$ ). As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado por acaso; existe uma diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,004$ ).

Considerando que nas duas condições em que havia presença de traços de acetona, notou-se que a EGF na presença de  $17\beta$ -estradiol foi superior as demais condições, indicando uma influência mais específica de tal composto. Tal fenômeno também é explicado pela ação antioxidante que tal composto exerce, pois tem-se uma condição no qual o IE soma sua atividade antioxidante ao também oxidante  $\alpha$  – tocoferol – composto esse essencial a fotossíntese. (CAVALIERI et al., 2000). A própria pesquisa realizada por Stacey (1996) comparou a atividade antioxidante de  $17\beta$ -estradiol com outros antioxidantes solúveis em lipídeos ( $\alpha$  – tocoferol e  $\beta$  – caroteno). Evidenciou-se neste estudo que o estradiol foi tão eficaz como agente antioxidante quanto ao  $\alpha$  – tocoferol, em termos de peroxidação de ácidos graxos. Com o incremento das atividades antioxidantes, há uma maior eficiência no impedimento da decomposição oxidativa de clorofila, das membranas lipídicas e das proteínas sensíveis a Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). (PINTO et al., 2014).

Portanto, mesmo com a situação não favorável referente a alterações comportamentais como inibição da gravitaxia e alteração em r-value, tem-se um efeito compensatório que faz com que as algas se adaptem bem a presença do IE em estudo, uma vez que – mesmo não sendo a melhor fonte de carbono como nutriente - a atividade antioxidante do IE favorece o desenvolvimento das funções energéticas por proteção das clorofilas presentes.

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados de Média Mensal de Produção (MMP). Nesta tabela observa-se, que existe uma produção mais acentuada de formulações denominadas

“sólidas”, nas quais se incluem cápsulas utilizadas oralmente. Elas representam mais da metade de todas as formulações produzidas no período avaliado.

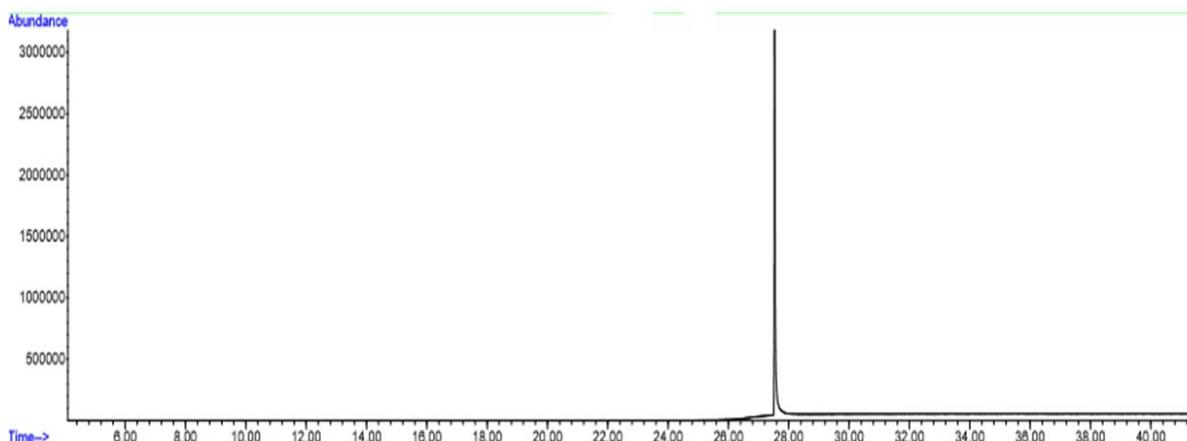
**Tabela 3.** Número de formulações produzidas de janeiro a julho de 2014.

Laboratório	Nº de formulações dos últimos 06 meses	Representação (em porcentagem)
Psicotrópicos	3150	18,6
Hormônios	728	4,3
Sólidos	9388	55,5
Dermato	3638	21,5
Total	16904	99,9

Fonte: registros da Farmácia.

Em segundo lugar estão as formulações de “dermato”, nas quais se tem cremes em que são incorporados diversos ativos. Em menor quantidade aparecem as formulações da Portaria 344/98, que segundo a legislação vigente exige um laboratório a parte, assim como o dos hormônios – objeto principal deste estudo. Com relação a manipulação de hormônios, a quase totalidade (99%) correspondiam a manipulação de valerato de estradiol, um análogo estrutura do 17 $\beta$ -estradiol utilizado em várias condições clínicas.

Uma análise via CG MS foi realizada da amostra do LMH, e foi identificado a presença do IE valerato de estradiol, conforme pode ser visualizado no cromatograma apresentado na figura 21.

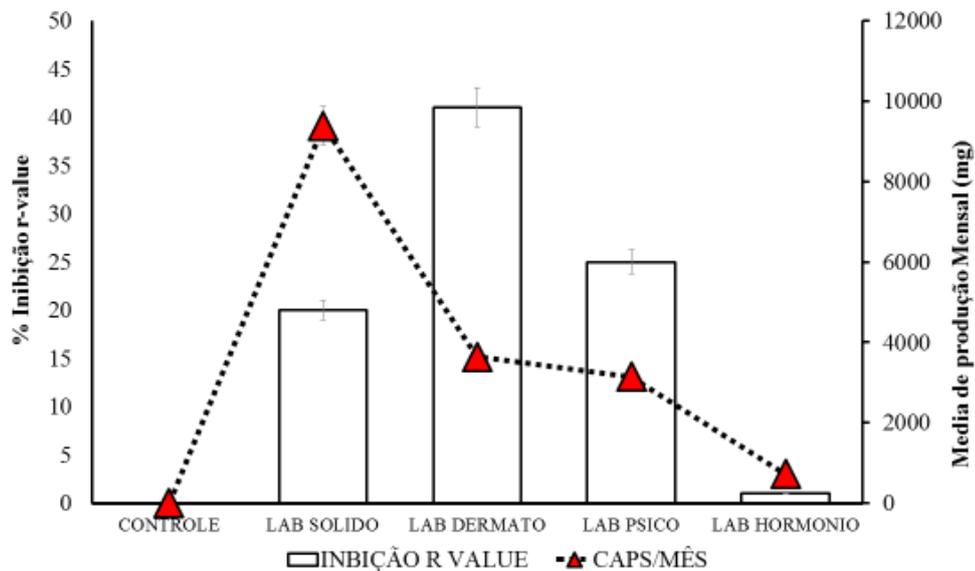


**Figura 21.** Cromatograma detectando presença de IE no LMH.

Frente a essas informações, partiu-se para análise do LMH e dos demais laboratórios a fim de se verificar alterações comportamentais e energéticas de risco.

Em testes realizados via NGTOX, todas as amostras contendo algas submetidas ao contato com os efluentes brutos analisadas apresentaram algum tipo de alteração comportamental quando comparada aos controles – amostras que continham apenas algas sem contato com efluentes e expostas a água de acesso. Dentre essas alterações comportamentais apresentadas, a única que apresentou resultados significativos foi o de inibição do comportamento r-value, condição essa que pode ser impactante para a atividade fotossintética e apresentar risco ambiental, mas no que diz respeito a análise considerando presença de IEs de potencial antioxidante, tal influência pode ser neutralizada. (PINTO et al., 2017).

Observa-se na Figura 22 que – de forma geral - no teste de alterações comportamentais das algas, que o Laboratório de Sólidos, que representa 55,5% da produção semestral, apresentou uma inibição de r-value de 20%, um comportamento semelhante ao apresentado pelo Laboratório de Psicotrópicos, que apresentou inibição de aproximadamente 24% neste comportamento das algas. Porém, vale ressaltar que este último laboratório, em comparação com o de sólidos, apresenta produção menor - 18,6% da produção total no mesmo período.

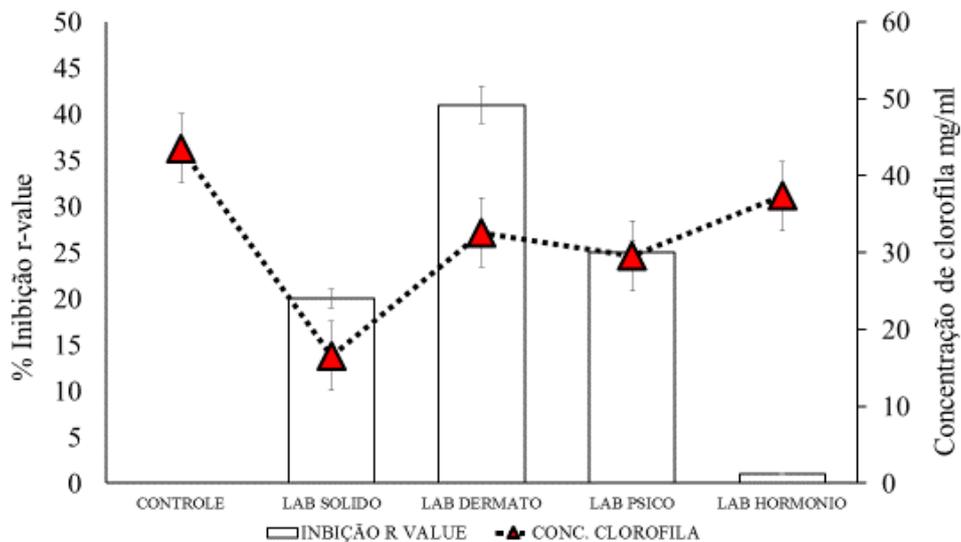


**Figura 22.** Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk) ( $P < 0,050$ ).  $H = 17,461$  com 5 graus de liberdade. ( $P = 0,004$ ). As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado por acaso; existe uma diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,004$ ).

O maior índice de inibição de r-value observado ficou por conta das análises realizadas nas amostras dos efluentes do Laboratório de Dermato; este demonstrou uma inibição de aproximadamente 42% e teve uma produção semestral de 3.638 formulações, o que representa apenas 21,5% da produção total dos últimos seis meses, sendo o que mais produziu e, conseqüentemente, contribuiu para uma maior concentração de contaminantes nos efluentes. O LMH – objeto principal deste estudo por conter IEs - teve uma baixa representação na demanda semestral, e também apresentou uma baixa inibição de r-value - cerca de 2% de inibição quando comparado ao controle.

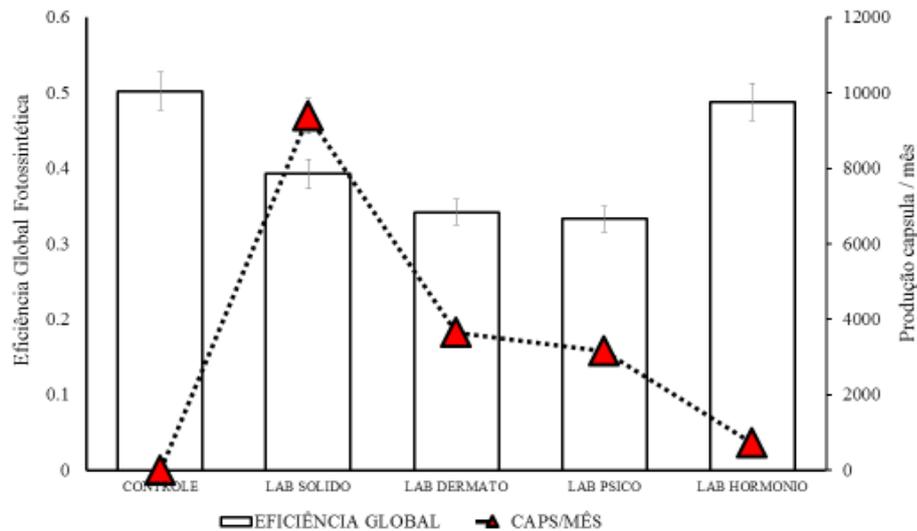
Na Figura 23 estão apresentado os estudos realizados com o efluente bruto demonstraram que todas as amostras contendo algas submetidas ao contato com tais efluentes apresentaram algum tipo de alteração comportamental, quando comparadas aos controles [1] testes feitos em culturas que continham apenas algas sem contato com efluentes; e [2] culturas com a presença de água de acesso.

No que se refere a concentração de clorofila a, observou-se variações diversas, sendo que o Laboratório de Sólidos o que mais apresentou variação negativa na concentração dessa substância em relação ao LMH e aos demais laboratórios também. O LMH, por sua vez, teve um comportamento semelhante aos resultados encontrados nos IEs preparados em solução padrão, mostrando existir uma correlação entre essas características estudadas.



**Figura 23.** Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk) ( $P < 0,050$ ).  $H = 17,461$  com 5 graus de liberdade. ( $P = 0,004$ ). As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado por acaso; existe uma diferença estatisticamente significante ( $P = 0,004$ ).

Na Figura 24 estão apresentados os ensaios de Eficiência Global Fotossintética (EGF), que apresentou resultados diferentes para as amostras dos laboratórios estudados gráfico 24, o que demonstra que não foi apenas uma questão de alteração de viscosidade, mas sim de eficiência fotossintética. A fotossíntese foi comprometida mais significativamente pelas amostras dos Laboratórios de Sólidos, Dermato e Psicotrópicos.



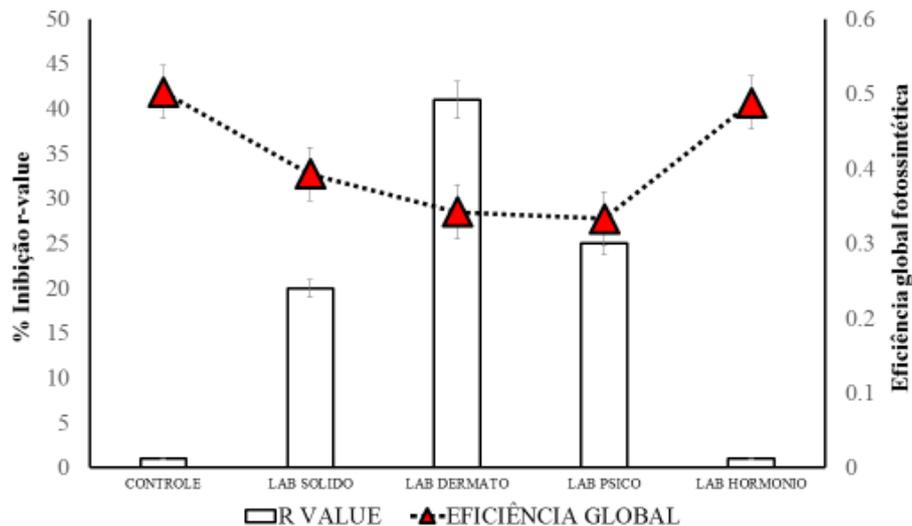
**Figura 24.** Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk) ( $P < 0,050$ ).  $H = 17,461$  com 5 graus de liberdade. ( $P = 0,004$ ). As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado por acaso; existe uma diferença estatisticamente significante ( $P = 0,004$ ).

As amostras do Laboratório de Sólidos, responsável pela segunda menor inibição de r-value (20%) demonstraram também, no teste de Eficiência Fotossintética no PAM, a segunda menor inibição da atividade fotossintética, apresentando um índice de EGF de 0,4. Apesar dessas alterações, esse laboratório demonstrou, em relação aos laboratórios de Dermato e Hormônios, causar menor impacto ao micro-organismo analisado nos ensaios de exposição aguda.

A grande maioria dos estudos envolvendo o descarte de medicamentos apontam os Anti-Inflamatórios Não Estereodais (AINEs), hormônios e psicoativos como as principais classes encontradas no ecossistema analisado. Segundo estudo conduzido por Santos et al. (2010), os AINES, seguido pelos antibióticos, agentes dislipidêmicos e hormônios são as principais classes envolvidas em episódios de contaminação do ambiente por químicos de utilização terapêutica. Porém, se extrapolou-se a quantidade do Laboratório de Hormônio - LMH, que

obteve o menor índice nos testes executados, para a mesma quantidade de formulações do laboratório de sólidos tem-se, para as análises de hormônios, 25,79% de inibição de r-value reforçando a hipótese de que Laboratório de Sólido possui a menor taxa de impacto ambiental dentre as demais classes analisadas.

Na figura 25, observa-se que efluente do Laboratório de Psicotrópicos, que teve uma inibição superior com r-value de 25% no teste anterior, nesta etapa, se comportou de forma diferente e apresentou a maior inibição fotossintética dentre as amostras analisadas, com EGF de 0,33 (Figura 21) evidenciando que a quantidade aqui não foi o determinante para a redução da eficiência, mas sim a natureza dos compostos encontrados nos efluentes.

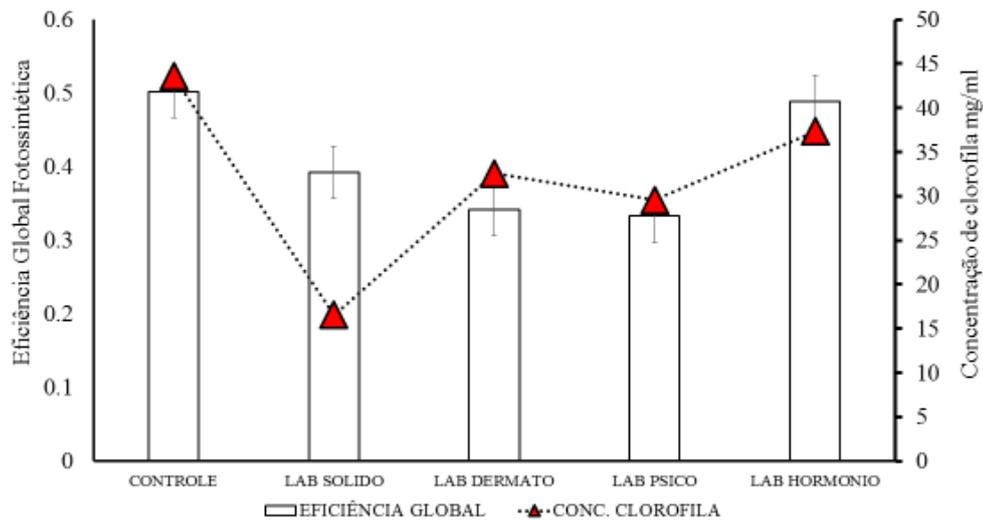


**Figura 25.** Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk) ( $P < 0,050$ ).  $H = 17,461$  com 5 graus de liberdade. ( $P = 0,004$ ). As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado por acaso; existe uma diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,004$ ).

Esses resultados refletem a condição que existem substâncias que influenciam o r-value por exercerem alguma atividade biológica dentro das algas, modulando canais de membrana que resultariam na redução do alcance do potencial de ação, o que provavelmente dificultaria o alcance da luz e, conseqüentemente, a inibição na EGF acaba sendo mais impactante. Além disso, segundo o Manual de Farmacologia e Terapêutica de BRUNTON et al. (2012), a grande maioria dos psicotrópicos é constituída por moléculas altamente lipofílicas, o que permite uma rápida penetração nas membranas celulares, resultando em uma rápida absorção e distribuição e maior acesso ao sistema nervoso central.

Acredita-se que, o aumento na oferta de aporte energético com a incorporação dos lipídios presentes nas amostras desse laboratório possa ter influenciado no processo de fotossíntese de maneira similar ao ocorrido com as amostras do Laboratório de Dermato. De forma semelhante ao ocorrido no ensaio via NGTOX, no qual apresentou a maior alteração comportamental com inibição de r-value de 42%, as amostras obtidas do Laboratório de Dermato, apresentaram um alto índice de comprometimento da eficiência global fotossintética, ficando com a segunda maior inibição do teste no PAM, com EGF de 0,35, conforme se observa na Figura 26.

Esses resultados refletem à questão do aumento da oferta de lipídeos contidos nas amostras desse laboratório, que podem ter influenciado na fotossíntese.



**Figura 26.** Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk) ( $P < 0,050$ ).  $H = 17,461$  com 5 graus de liberdade. ( $P = 0,004$ ). As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado por acaso; existe uma diferença estatisticamente significante ( $P = 0,004$ ).

O LMH que teve influência na questão comportamental inferior aos demais laboratórios, entretanto em relação ao controle, principalmente o r-value teve um valor de inibição significativamente maior, como também ocorreu na solução padrão teste. A alteração de r-value implica em perda da uniformidade dos movimentos do conjunto de algas, o que pode influenciar outros parâmetros de interesse ecotoxicológico, como a eficiência fotossintética, que se alterada, aponta um risco ambiental, já que indica que há uma mudança no comportamento indicando risco. (BELSHE et al., 2007).

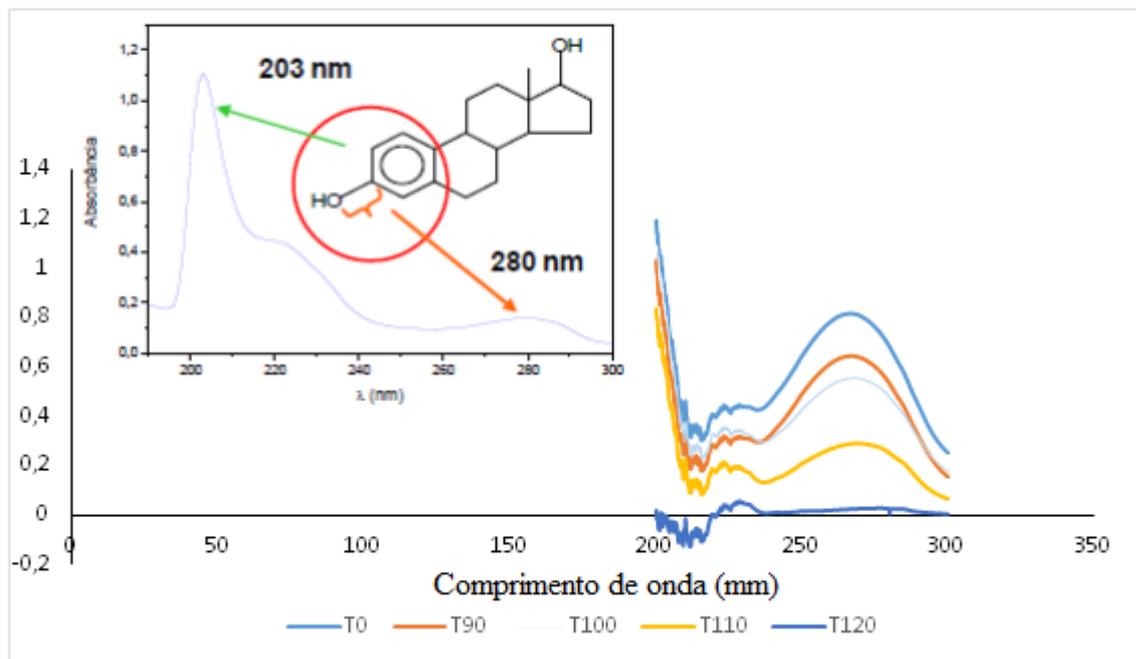
Os efluentes do LHM por sua vez não apresentaram uma influência relevante na atividade fotossintética das algas, com um valor muito próximo ao do valor encontrado no controle: uma EGF de 0,49 contra 0,51 do controle, isso mesmo apresentado r-value diferente. Ressalta-se que esta condição também foi encontrada quando as algas foram submetidas a testes com IE na SPC. Tal condição implica em similitudes que credenciam as algas a uso em testes envolvendo IEs presentes em efluentes. A manutenção de uma boa atividade fotossintética é explicada também pelo que já foi visto no estudo anterior, em que a atividade antioxidante compensa as alterações comportamentais.

A baixa inibição relativa frente aos demais laboratórios apresentados pelo efluente do Laboratório de Hormônios pode ser atribuída à demanda de produção semestral pequena (cerca de 4,3% da produção total), observada na figura 20, o que inferiu à amostra estudada uma baixa concentração de ativos quando comparada com os demais laboratórios.

As análises foram direcionadas simulando uma exposição aguda. Buscou-se neste primeiro momento, verificar se haveriam impactos iniciais que fossem significativos e sugestivos de novas análises e testes de exposição crônica. A importância de tal conduta reside no fato da necessidade de testes rápidos, que possam remediar efeitos deletérios o quanto antes. (CORDEIRO, 2009). O teste de eficiência global fotossintética buscou, em um segundo momento, identificar a influência das amostras analisadas sobre a atividade fotossintética das algas *E. gracilis*.

Outro fator observado é que não existe uma relação direta entre as alterações encontradas sobre os valores de r-value e o decréscimo da EGF. Em algumas situações, a alteração de r-value pode ter sido influenciada fisicamente pela viscosidade da amostra, visto que pela análise em viscosímetro, constatou-se alteração pouco significativa frente a água de acesso, sendo o efluente advindo do Laboratório de Dermato foi o mais influenciado pelo aumento da viscosidade, o que poderia comprometer a dispersão das algas no meio. Porém tal alteração levou a discreta influência no processo de fotossíntese, uma vez que, as amostras do Laboratório de Dermato que apresentaram maior valor de inibição do r-value tiveram menor inibição na EGF.

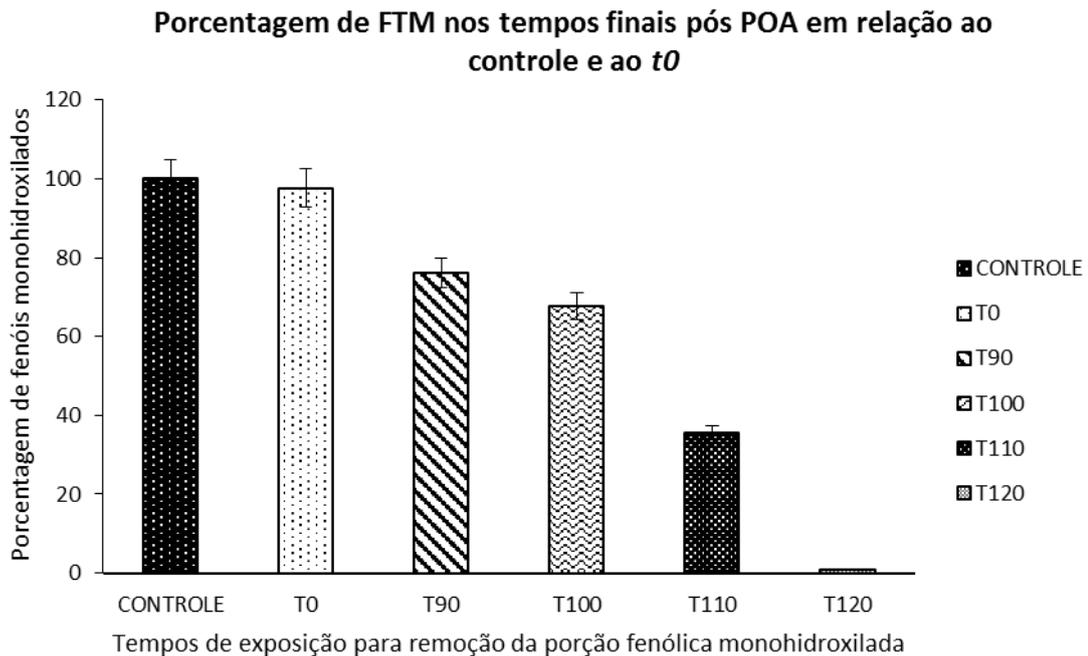
Na Figura 27 esta apresentada o modelo de feito por Bila et al. (2007), na remoção da atividade estrogênica, o que se observou foi um decréscimo da presença da HTM; resultado este esperado e que atestou a existência de um processo de inativação da atividade estrogênica que é atribuída a este grupo, conforme se observa na figura 27.



**Figura 27.** Modelo de remoção feita por Bila et al. (2007) apontando as bandas utilizadas para análise e quantificação de presença do grupo farmacofórico: Hidroxila trissubstituída com porção monofenólica. Tempo de exposição ao POA O<sub>3</sub>/UV expresso em minutos (T0/T90/T100/T110/T120).

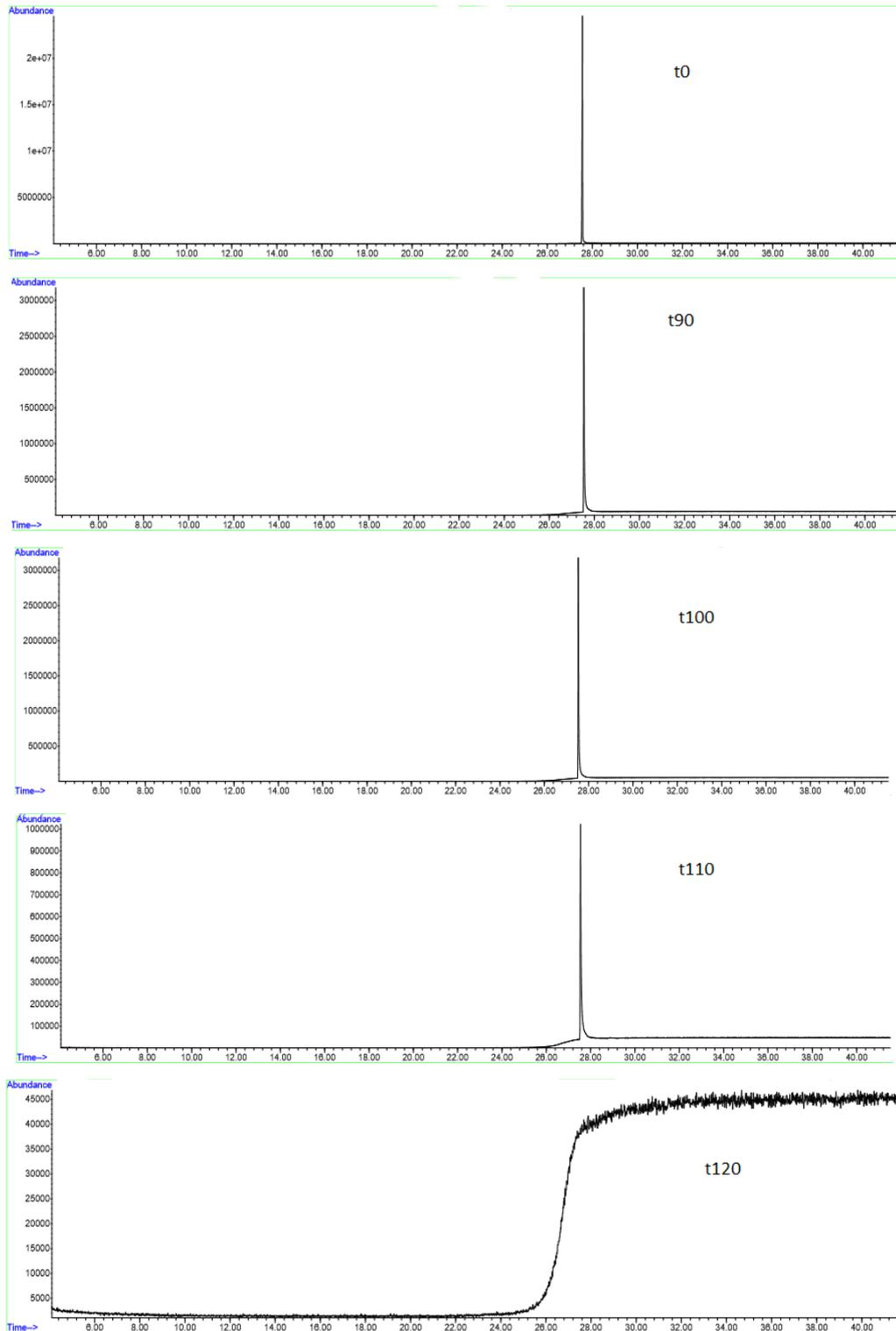
As absorvâncias observadas em 203 e 280 nm apresentaram quedas em seus picos, tendo-se uma redução dos mesmos nos tempos estudados, sendo que em *T120* (*tempo de exposição de 120 minutos*) não há mais detecção deste pico. Tais resultados corroboram com o que foi estudado por Bila et al. (2007) no qual este parâmetro foi utilizado para verificar de forma indireta a remoção da atividade estrogênica (Figura 2).

Através dos valores encontrados e expressos na figura anterior (23), do tempo zero minuto (T0) até o tempo 120 minutos (T120), no comprimento de onda de 280nm – observou-se que a presença do HTM foi diminuindo ao longo da exposição a luz UV. A redução da presença de HTM se deve pela ocorrência de reações de oxidação em que a hidroxila se transforma em outro composto, que foi investigado mais à frente. A porcentagem dessa diminuição pode ser calculada pela *Equação 1* proposta por Bila et al. (2007), sendo os resultados encontrados plotados na Figura 28.



**Figura 28.** Teste de Wilcoxon: Z-Statistic (com base em classificações positivas) = 3,734. P (est.) = <0,001 P (exato) = <0,001. A correção de Yates para a continuidade foi usada no cálculo desse teste.

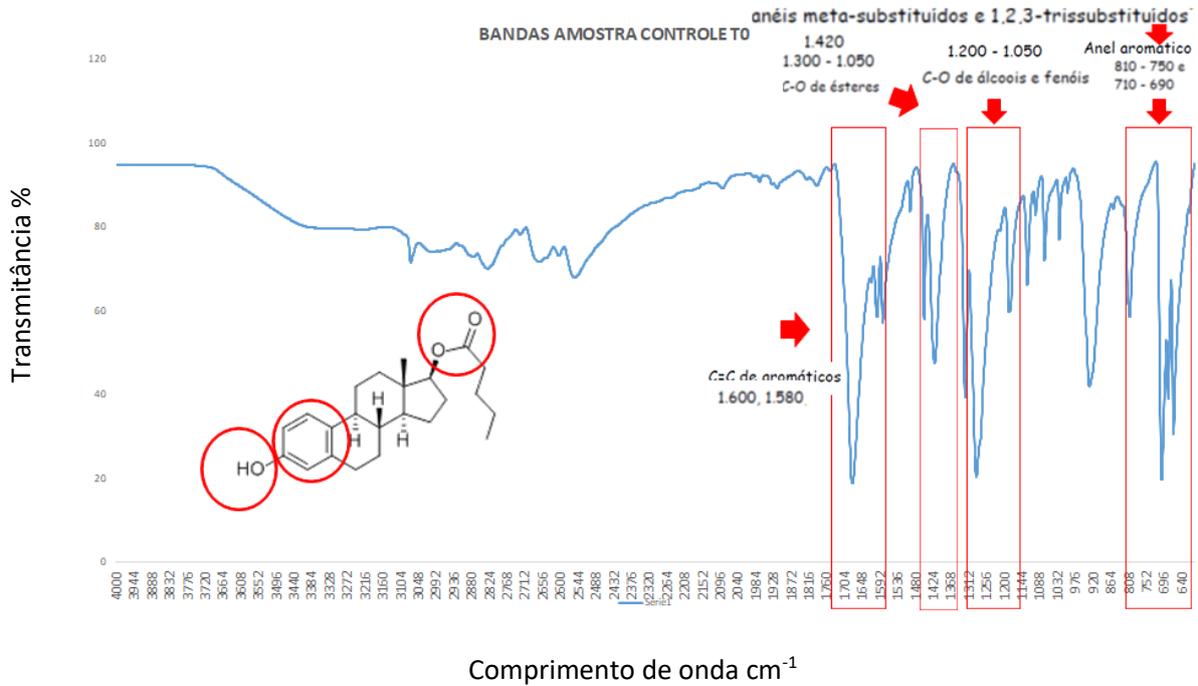
Nota-se que a remoção do HTM não teve uma diferença significativa no  $t_{120}$  em relação ao  $T_0$  e o controle (Figura 29), no qual  $T_0$  se igualou ao controle e os outros tempos foram diminuindo gradativamente, sendo que no tempo final ( $T_{120}$ ), o produto presente não é um HTM, podendo ter ocorrido a formação de fenóis dihidroxilado tetrasubstituídos, ácidos carboxílicos pela abertura do anel aromático, ou ainda a degradação em compostos menores. A varredura via CGMS confirmou a presença do Valerato de  $17\beta$ -estradiol no  $t_0$ ,  $t_{90}$ ,  $t_{100}$ ,  $t_{110}$ , mas não foi detectado em  $t_{120}$  (Figura 25), confirmando sua remoção neste último tempo e corroborando com resultados de BILA et al. (2007). Posteriormente foram identificados os produtos com a utilização da espectrofotometria no infravermelho.



**Figura 29.** CG MS das amostras retiradas nos tempos 0, 100, 110 e 120 minutos.

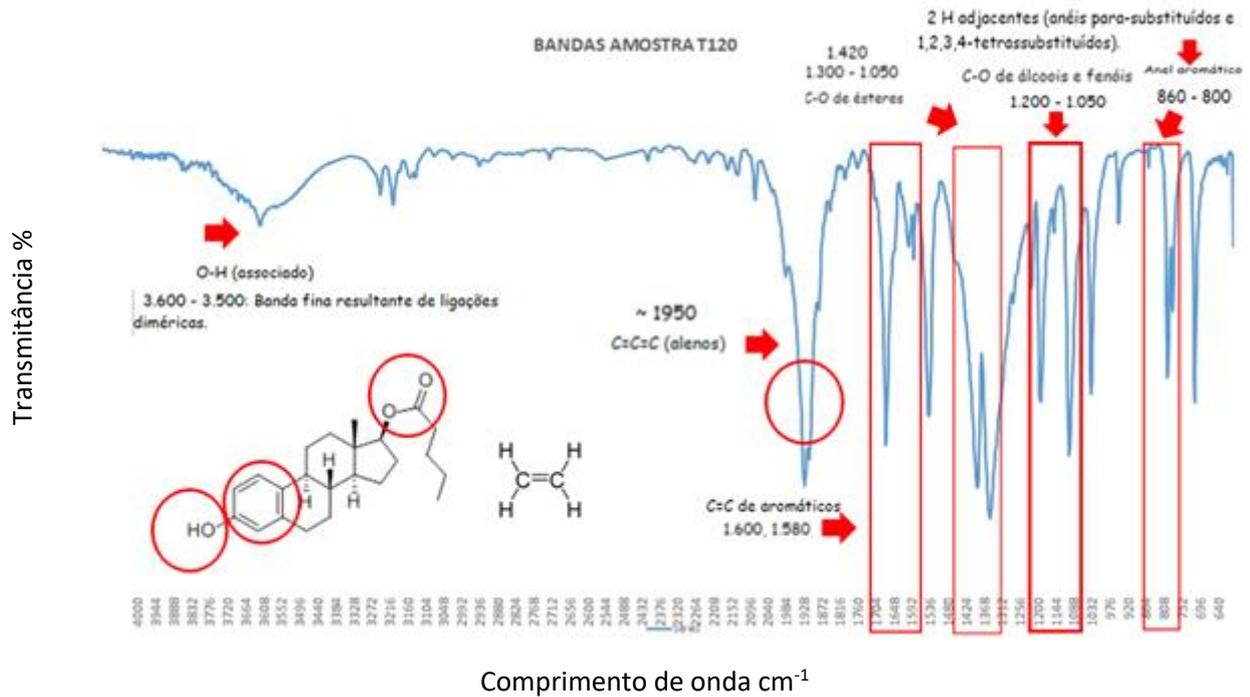
Considerando então a possibilidade da formação de outros compostos ao final da remoção do HTM por  $O_3/UV$ , foi analisado em infravermelho as amostras do tempo zero e do tempo 120. O espectro de infravermelho da amostra do  $t0$  (Figura 30), confirma a presença apenas do Valerato de  $17\beta$ -estradiol, conforme as bandas identificadas que sugerem a presença

de anéis aromáticos trissubstituídos, além das ligações carbono e hidrogênio, carbonila (função éster) e ligações duplas de sistemas aromáticos, culminando no composto final que confirma ser o valerato de estradiol.



**Figura 30.** Bandas identificadas no infravermelho tempo zero, contendo apenas o valerato de  $17\beta$ -estradiol.

Já no segundo espectro de infravermelho obtido a partir da amostra do *t*120 (Figura 31), nota-se bandas referentes a anéis aromáticos tetrassubstituídos, e ligações duplas de alenos e etilenos, e presença de hidroxila associada em banda mais evidente, sugerindo a presença de ácidos dicarboxílicos. Portanto, indica que ao final de duas horas de remoção, obteve-se um perfil distinto da amostra do *t*0.



**Figura 31.** Bandas identificadas no infravermelho tempo 120 minutos, contendo outro composto.

Sabe-se que o etileno, sendo um regulador vegetal que controla o processo de maturação, acelera a degradação da clorofila e ativa a síntese de carotenoides, através do aumento da expressão gênica da clorofilase, enzima responsável pela degradação da clorofila. (HEATON; MARANGONI, 1996). O etileno liga-se a um receptor proteico na membrana do Retículo Endoplasmático. Em seguida, esse receptor deixa de ativar uma proteína, a CTR1, que atua como reguladora negativa da cadeia de sinais químicos que produz a resposta biológica do etileno. Em outras palavras, a presença do etileno inativa uma proteína que atua como inibidora, fazendo então com que a resposta ocorra. Na ausência do etileno, a CTR1 inibe a formação dos fatores de transcrição que irão regular a expressão de genes de resposta ao etileno na planta, como a biossíntese de clorofila a, por exemplo. (CHAVES et al., 2002).

Ainda sobre a chance de degradação de clorofila, em 2015, IRMAK et al. descreveram que na reação com  $O_3/UV$  a adição do radical  $O_3/OH$  às diferentes posições do anel aromático leva à formação de vários intermediários com diferentes polaridades. O ataque mais provável das moléculas de  $O_3$  foi em uma das posições orto (para o grupo fenólico) do anel 17-estradiol aromático. Este grupo, como mencionado anteriormente, é responsável pela função farmacofórica do hormônio. Os intermediários identificados são supostamente ácidos dicarboxílicos que são formados pelo ataque de moléculas de  $O_3$  em duas das posições orto do

17 $\beta$ -estradiol. Os autores ainda descrevem que o 17 $\beta$ -estradiol mono-hidroxilado sofre uma conversão eficaz em ácidos dicarboxílicos.

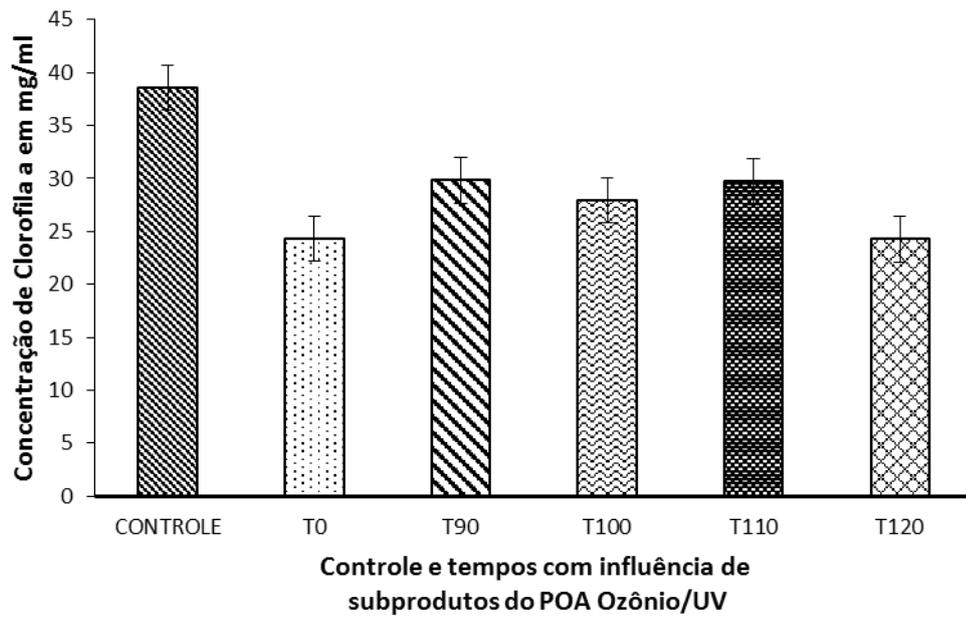
Essa conversão em ácidos carboxílicos pode afetar a atividade fotossintética, pois segundo MOSS (1967), a conversão de clorofila em seus respectivos derivados inativos, principalmente a feofetina, ocorre pela perda de magnésio na presença de ácidos, especialmente ácidos carboxílicos. Este produto de degradação da clorofila não suporta a atividade fotossintética e compromete toda sua atividade fisiológica.

Dalmázio (2007) descreveu a possibilidade de dois modelos para a remoção do grupo farmacóforo. Assim, a partir da sequência apresentada nesta rota, sugere-se que a reação seja iniciada pelo ataque do radical hidroxila às posições ativas (orto e para) do anel fenólico, levando assim à formação de di-hidroxibenzeno. A oxidação subsequente gera a quinona, que, através de sucessivas hidroxilações, finalmente produz o ácido carboxílico acíclico através de um ataque nucleofílico de H<sub>2</sub>O no carbonil seguido por abertura do anel.

Frente a essas possibilidades, ensaios a respeito da concentração de clorofila foram então realizados.

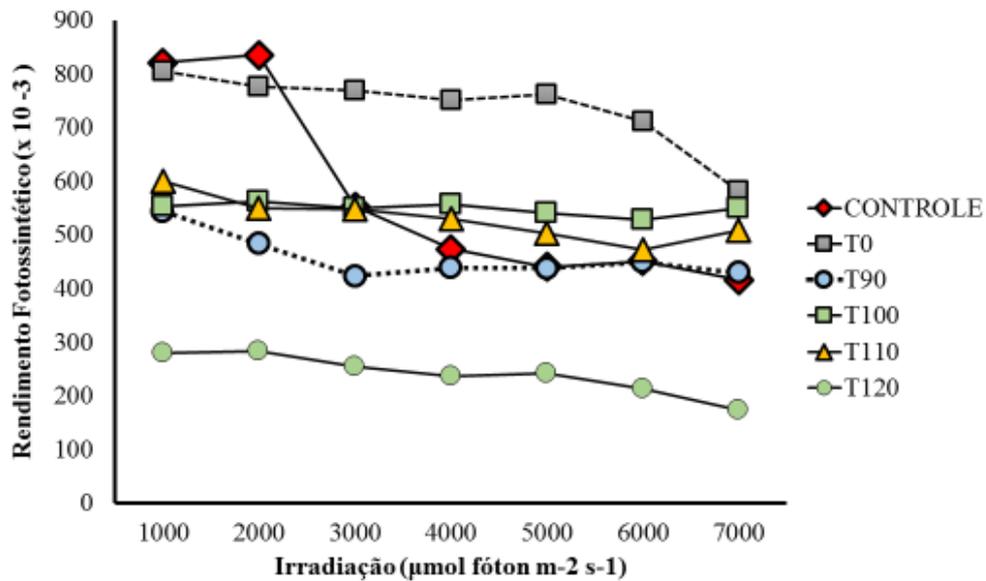
A redução da clorofila é resultado de sua degradação, no qual diversos fatores interferem na sua degradação, como: a luz, radiação, calor, ácidos, oxigênio, alteração enzimática e interação com outros pigmentos. (STREIT et al., 2005). Ainda, estudos mostram que a decomposição das clorofilas em sistemas aquáticos tem quantitativamente e ecologicamente significado em relação aos ambientes terrestres. (STREIT et al., 2005).

No gráfico da figura 32, é possível observar que houve oscilação nas concentrações de clorofila entre os tempos  $t0$  e  $t120$  e o controle, sendo que todos os tempos tiveram sua concentração menor que a obtida no controle, estando o tempo  $t120$  entre as concentrações mais baixas de clorofila, ou seja, houve redução significativa entre os grupos testados e o controle, mas não entre eles (testados), sendo a redução sem significância estatística.



**Figura 32.** Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk) ( $P < 0,050$ ).. As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado por acaso; existe uma diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,004$ ).

O rendimento fotossintético (yield) foi calculado segundo a Equação 2, e os resultados estão apresentados na Figura 33:

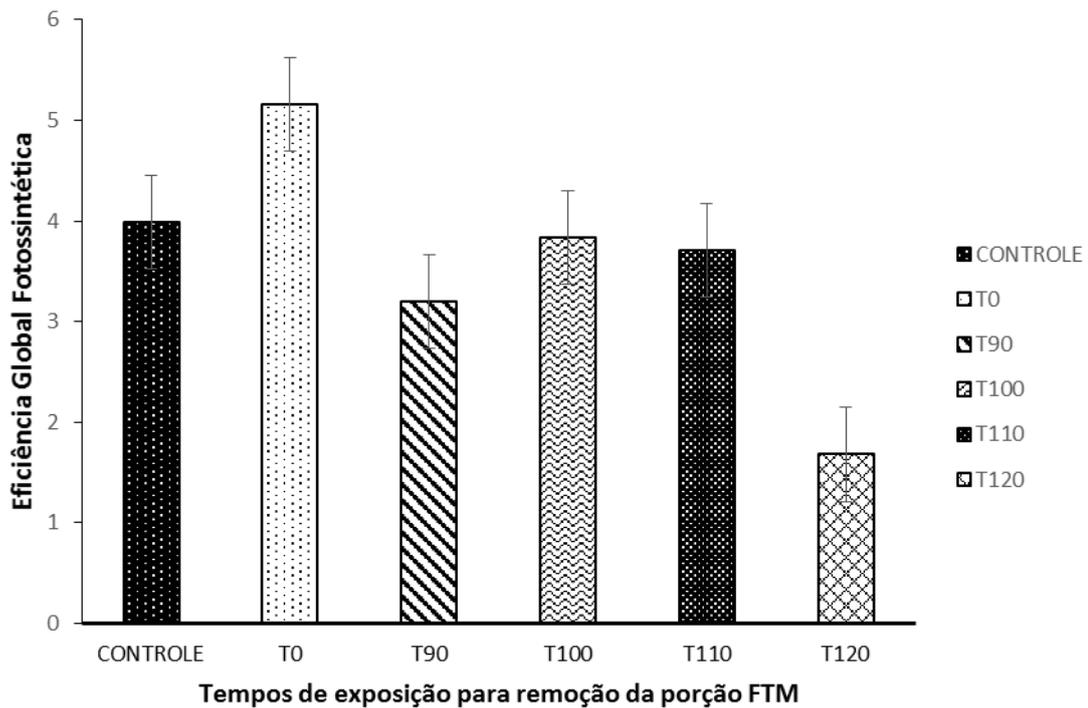


**Figura 33.** Perfil do rendimento fotossintético efetivo de PSII em *E. gracilis* tratadas com resíduos de diferentes tempos de remoção de estradiol em diferentes tempos.

Na figura 29, observa-se que não houve similaridade de resultados, isso pode ser devido à presença do composto fenólico, já que o fenol monohidroxilados trissubstituído só foi removido com eficácia do *t120*, porém este teve seu rendimento reduzido que pode ter ocorrido em função de seu maior tempo de irradiação. Já o *t0* obteve um perfil diferente dos demais, pois que o estradiol, que está presente em maior concentração neste tempo, é antioxidante e incrementa a transmissão de elétrons, apresentando esse comportamento previsível. A ação antioxidante do estradiol se deve ao seu envolvimento em um ciclo redox que envolve o anel catecol presente na molécula de estrógeno, que é então convertido em quinona por transferência de elétrons. (LIEHR et al., 2008).

Utilizou-se o teste ANOVA multivariada, no qual as diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado por acaso, tendo uma diferença estatisticamente significativa entre controle e os testes ( $P = 0,031$ ). Assim, houve uma mudança no comportamento das algas no que se refere aos compostos formados pós remoção do valerato de  $17\beta$ -estradiol, seja pela diminuição de sua concentração e consequente poder antioxidante (LIEHR et al., 2008) e/ou pela ação dos etilenos que foram identificados no *t120*. (STREIT et al., 2005).

A eficiência fotossintética, sendo um parâmetro de grande valia para a ecotoxicidade, aponta se houve ou não mudança comportamental em relação a fotossíntese desses animais, indicando um possível risco ambiental (PINTO et al., 2016). A eficiência fotossintética global foi calculada segundo a Equação 3, e os resultados estão apresentados na Figura 34.

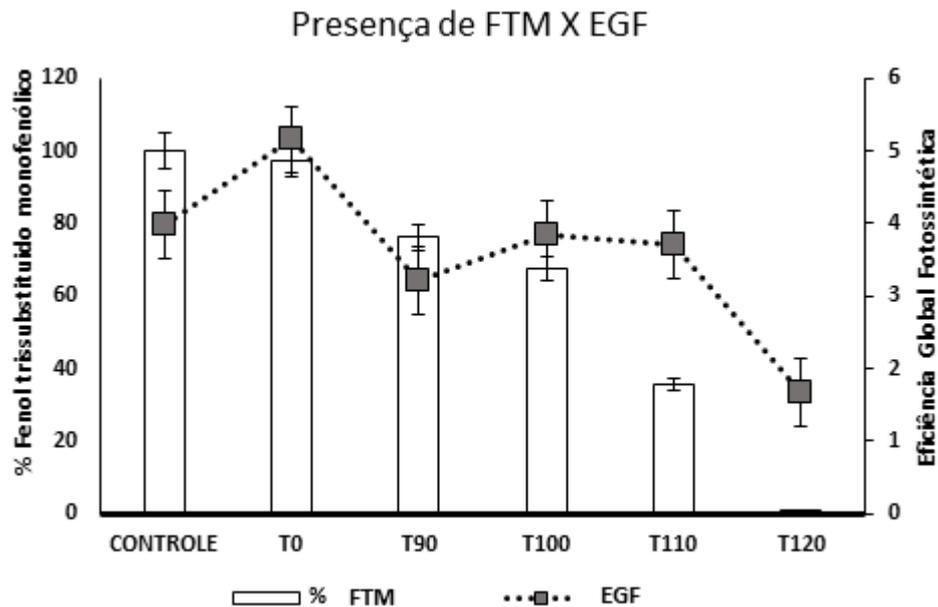


**Figura 34.** Comparação da Eficiência Global Fotossintética (valores x 10<sup>-1</sup>) das algas frente a exposição de resíduos em diferentes tempos de remoção de estradiol via POA Teste de Wilcoxon: Z-Statistic (com base em classificações positivas) = 3,181. P (est.) = 0,002 P (exato) = <0,001. A correção de Yates para a continuidade foi usada no cálculo desse teste.

Nota-se que ao longo da exposição à luz saturante via PAM, pode-se observar que houve uma redução dessa eficiência se comparar, principalmente, o controle e o *t120*, indicando que a presença de compostos pós POA teve uma influência negativa sobre a eficiência fotossintética global. Há uma diferença estatisticamente significativa entre a mediana do grupo e a média da população hipotética ( $P = <0,001$ ). Já, no *t0*, o aumento na eficiência fotossintética global já era esperado devido à ação do estradiol, que conforme explicado anteriormente, possui ação antioxidante. (LIEHR et al., 2008; STREIT et al., 2005).

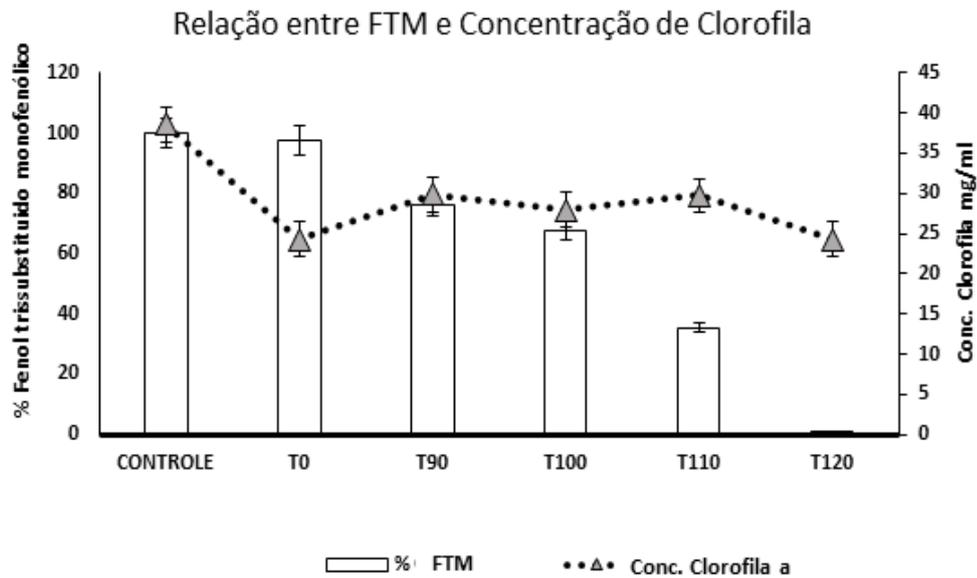
Analisando a influência da presença de HTM sobre a eficiência global fotossintética observa-se, que não se tem uma correlação que aponte que a diminuição de HTM ocasiona a redução da eficiência da fotossíntese, visto que, em todos os tempos testados, a variação da EGF não acompanhou a % de HTM encontrada, tendo-se em *t0* um certo valor de EGF frente a quase 100% de HTM semelhante ao *t120*, condição em que se tinha ausência de HTM (Figura 35). Tal condição reforça a hipótese de que o que influencia sobre a EFG é devido a formação de etilenos e ácidos carboxílicos, visto que esses compostos, em níveis aumentados, são

responsáveis pela degradação da clorofila, pigmentos instáveis, que explica o comportamento observado no estudo. (STREIT et al., 2005).



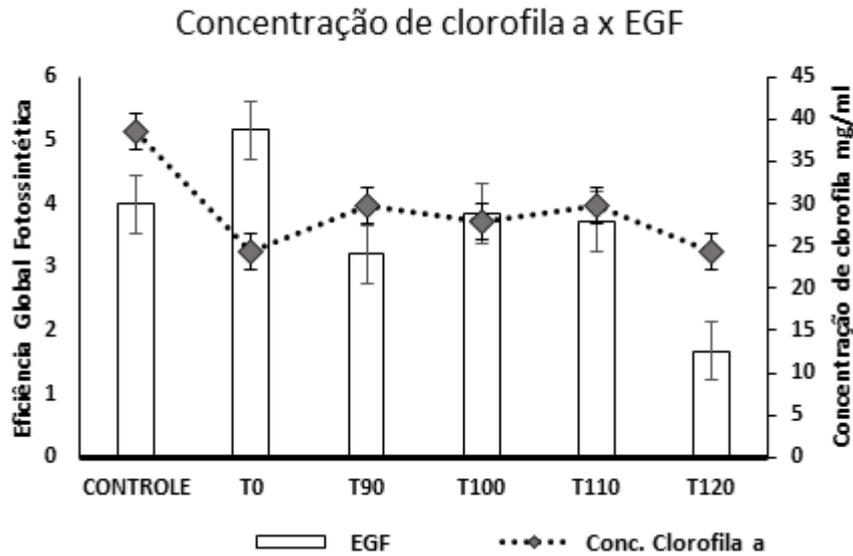
**Figura 35.** Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk) ( $P = 0,132$ ). há diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,093$ ).

À medida que se remove os HTMs, poderia se esperar uma influência na concentração da clorofila nas algas, mas nesse caso tal hipótese não se confirmou, pois não houve diferença estatística entre as variáveis estudadas (Figura 36). A remoção da porção fenólica monohidroxilada então expressou uma influência ou correlação com a queda na concentração de clorofila, abrindo a possibilidade para a hipótese que aponta para a influência dos compostos menores oriundo da degradação, como os etilenos, como os responsáveis pelas mudanças na EGF, como apontado na Figura 36, uma vez que o etileno é capaz de degradar a clorofila (STREIT et al., 2005) e aí sim comprometer a EGF.



**Figura 36.** Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk) Falha ( $P < 0,050$ ). A diferença nos valores médios entre os dois grupos não é suficientemente grande para excluir a possibilidade de que a diferença se deve à variabilidade aleatória da amostragem; há diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,065$ ).

Na figura 37 é mostrada a relação entre a concentração de clorofila e a eficiência global fotossintética. A queda da eficiência global de fotossíntese está associada à concentração de clorofila ( $p = 0,002$ ), porém como observado na figura 37, ela não está ligada com a remoção do estradiol ( $p = 0,065$ ). Dessa maneira, como está ligada a concentração de clorofila, pode ser que a formação dos etilenos, como anteriormente citado, seja responsável por essa alteração na eficiência fotossintética nas algas *E. gracilis*. No t0, o aumento da EGF pode ser devido ao potencial antioxidantes dos IEs.



**Figura 37.** Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk) Falha ( $P < 0,050$ ). A diferença nos valores médios entre os dois grupos é maior do que seria esperado por acaso; há uma diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,002$ ).

O emprego dos processos oxidativos para remoção de atividade estrogênica do valerato de  $17\beta$ -estradiol é tópico concreto na literatura científica, porém pouco se avalia em relação aos efeitos e riscos biológicos que os compostos formados pós oxidação podem causar. A fim de contribuir nessa questão, no presente estudo identificou-se os compostos menores (etilenos) formados pós processos oxidativos, através da técnica de FTIR, e a partir disso foi feita a correlação com as mudanças observadas em culturas de *E. gracilis*.

Há ainda uma literatura muito escassa em relação à diversos assuntos ambientais, incluindo a ação de etilenos na atividade fotossintética. Sabe-se que os etilenos são substâncias responsáveis pela diminuição da fotossíntese, já que reduzem a síntese de clorofila (LIEHR et al., 2008; STREIT et al., 2005), explicando assim os resultados encontrados, como a redução da eficiência global fotossintética que está ligada a concentração de clorofila. Por sua vez, a remoção da porção fenólica monohidroxilada do  $17\beta$ -estradiol não influencia na concentração de clorofila, portanto, inferiu-se que a queda da concentração de clorofila está ligada a formação dos etilenos após os processos oxidativos avançados.

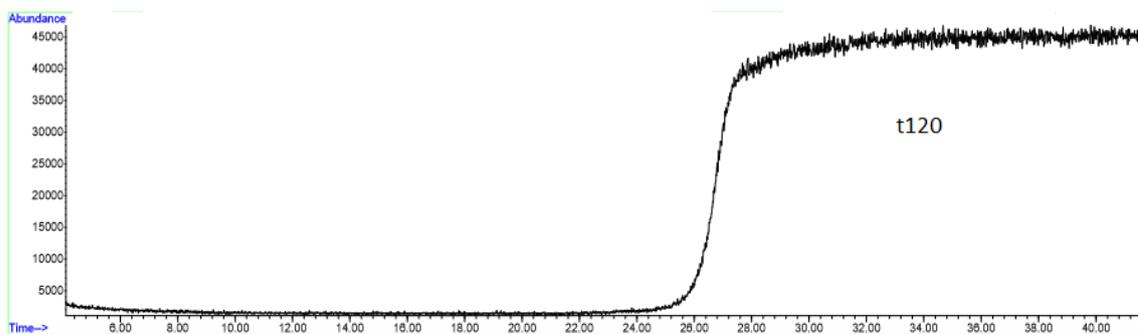
A eficiência na remoção das hidroxilas monofenólicas do  $17\beta$ -estradiol foi comprovada, havendo assim, a formação de intermediários posteriormente identificados como etilenos. Portanto, constatou-se que a remoção via processos oxidativos avançados utilizando  $O_3/UV$  não foi suficiente para garantir a segurança e total eliminação de perigos à saúde aquática e indiretamente a população, uma vez que se observou que o comportamento das algas *E. gracilis*

foi afetado, por meio da diminuição da eficiência global fotossintética e da concentração de clorofila.

Foi possível concluir que essas alterações não tiveram ligação com a queda da concentração de HTMs, mas sim com os produtos do POA, os etilenos, que são responsáveis pela degradação da clorofila. Portanto, testes em outros níveis tróficos devem ser aplicados, a fim de assegurar a influência dos etilenos em outros níveis e também devem ser propostas metodologias que visem o tratamento desses intermediários formados, a fim de não prejudicar o meio ambiente e alcançar uma remoção mais eficaz no que condiz à segurança dos processos empregados.

## **5.2 Remoção da atividade estrogênica presente nos efluentes e submissão a cultura de algas do CODs formados, com posterior comparação dos resultados encontrados com a exposição dos CODs obtidos na solução padrão controle.**

A figura 38 demonstra que após o processo oxidativo avançado, no tempo de 120 minutos, não havia mais presença do hormônio na amostra.

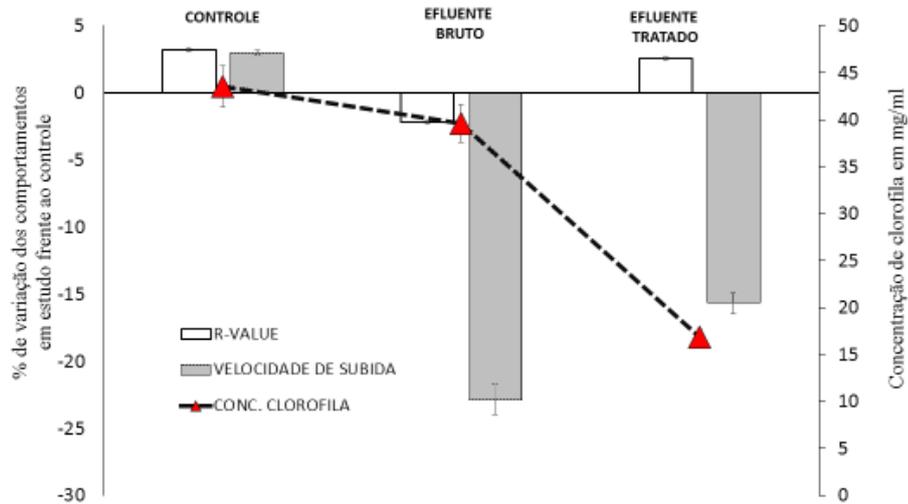


**Figura 38.** Cromatograma em CGMS mostrando ausência de IE após POA/UV por 120 minutos.

### **5.2.1.1 Influência dos CODs formados em efluentes tratados sobre o comportamento e concentração de clorofila nas algas, e a relação entre estas duas últimas variáveis.**

A presença de hormônios no efluente afetou significativamente a velocidade de subida a superfície, inibindo a mesma, assim como o r-value das algas. Tal fenômeno apresentou similaridade com o que já tinha sido observado na SPC. Já os CODs do efluente tratado também inibiu a velocidade de subida, mas não afetou o r-value.

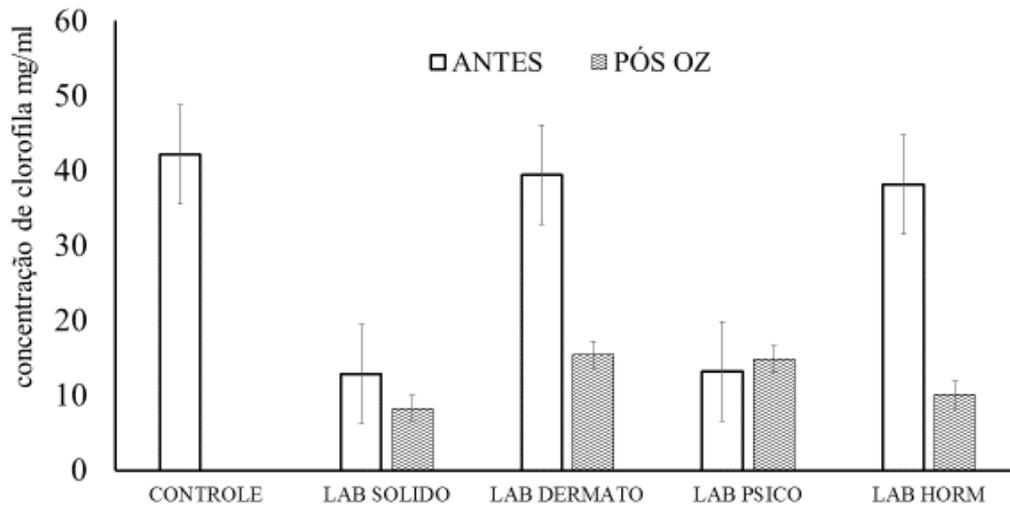
A concentração de clorofila por sua vez apresentou uma queda em sua concentração, devido a presença dos CODs, evidenciando mais uma vez que os IEs em estudo exercem proteção a clorofila a, impedindo sua degradação, certamente devido ao seu potencial antioxidante (Figura 39).



**Figura 39.** Alterações nos parâmetros comportamentais de *E. gracilis* expostas a efluentes pós ozonização do Laboratório de hormônios, comparados com o efluente bruto. Teste de correlação de Pearson: Existem relações significativas entre pares de variáveis ( $P > 0,050$ ).

Entretanto, vale ressaltar que os CODs, diferentemente dos IEs de origem, apresentam um certo potencial de degradação da clorofila, como já evidenciado no processo de remoção de IEs e formação de CODs em SPC.

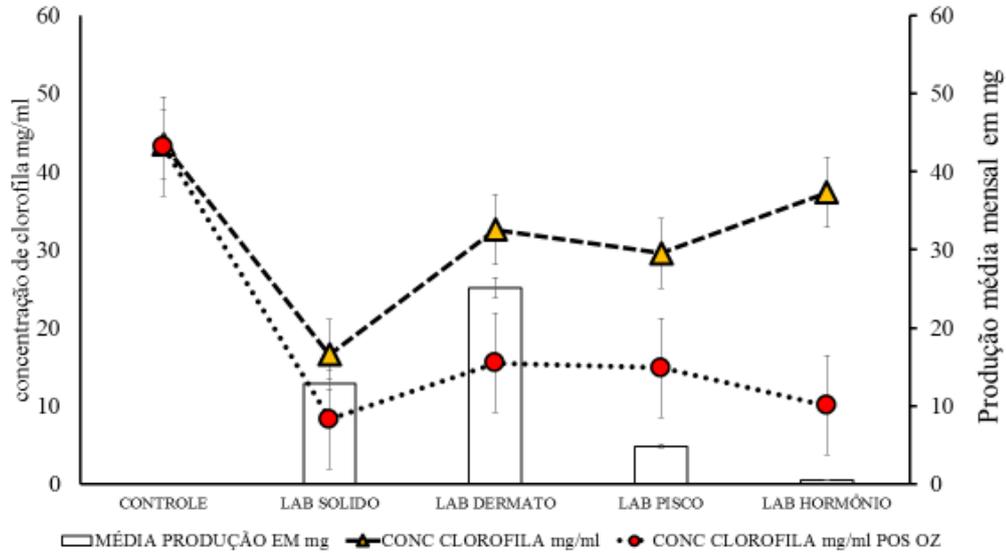
Para uma melhor compreensão deste efeito sobre degradação da clorofila pelos CODs, um comparativo entre as concentrações antes e depois do processo de ozonização foi realizado (Figura 40). Considerando a influência sobre a concentração de clorofila, notou-se uma clara diferença entre os laboratórios e nas condições pré e pós ozonização.



**Figura 40. Influência sobre a concentração de clorofila. Análise de Variância em Variantes Kruskal-Wallis.** As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado por acaso; há uma diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,011$ ).

Neste comparativo, observa-se que nos Laboratórios de Sólidos e Psicotrópicos apresentam queda na concentração de “clorofila a” já na presença do efluente bruto, sendo o resultado bastante similar quando comparado como os mesmos resíduos tratados com ozonização. Entretanto, no Laboratório de Dermocosméticos, assim como no LMH, quase não se vê influência do efluente bruto, mas sim do efluente tratado que passa a ter uma concentração semelhante aos demais laboratórios tratados com ozônio/UV. Vale ressaltar que o excesso de ozônio não estava presente, pois em reação com permanganato de potássio o resultado foi negativo para a presença de ozônio. A explicação para o LHM seria a atividade antioxidante, enquanto que uma provável explicação para o de dermatocosméticos seria que os produtos manipulados neste laboratório são altamente lipofílicos, e de pouca influência na fisiologia das algas. (ARONSSON; ECKELUND, 2005).

Mas uma outra variável importante a ser considerada trata-se da quantidade de ativos e demais substâncias que são despejadas pelas pias e que compõe o efluente bruto dos laboratórios. Para tal considerou-se a produção média mensal de seis meses da farmácia, e calculou-se a média mensal de produção (MMP) a fim de verificar qual a média de atividade dos laboratórios pré-ozonização. Frente ao cálculo realizado pela “Equação 1”, obteve-se os seguintes resultados apresentados na Figura 41.

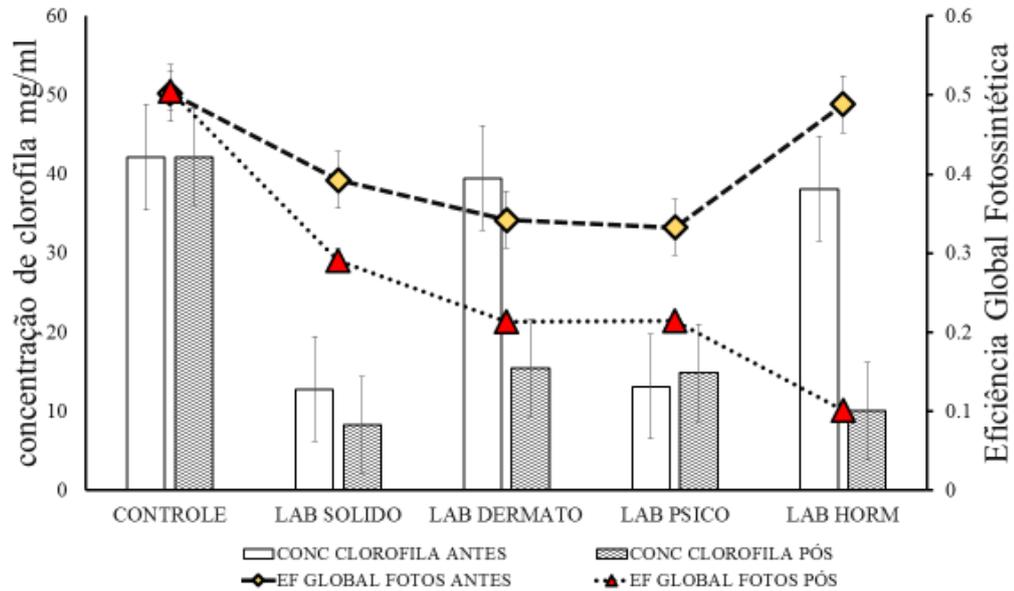


**Figura 41. Influência da quantidade produzida versus concentração de clorofila pré ozonização.** Teste de correlação de Pearson: alteração na concentração de clorofila do laboratório ( $P > 0,050$ ).

O efluente tratado que possui CODs que mais impacta – de forma independente – a concentração de “clorofila a” trata-se do Laboratório de Hormônios, visto que possui menor produção e redução significativa sobre a redução da concentração de “clorofila a”, e ao mesmo tempo, na presença do efluente bruto, é o que apresentava concentração similar ao controle.

Tem-se então uma clara situação em que o processo de remoção via ozônio/UV, no tempo de remoção total da atividade estrogênica, influencia na degradação de “clorofila a” a partir dos CODs, sendo que exceto no LMH, tanto o efluente bruto e o tratado influenciam a concentração de “clorofila a” reduzindo sua concentração. A queda na concentração de clorofila pode afetar a eficiência fotossintética das algas e gerar perigos de ecotoxicidade, isto quando não existe um mecanismo compensatório que garantam a sobrevivência das algas. Mas tal condição não isenta que tais efluentes precisam ser monitorados (HADER et al. 1985).

Notando-se então que a redução na concentração de “clorofila a” era fortemente influenciada pelos CODs, buscou-se saber se tais quedas influenciariam nas eficiências globais fotossintéticas das amostras pós ozonização, a fim de verificar se a concentração de clorofila influenciava de alguma maneira nesse parâmetro fisiológico, denotando mais um elemento de risco/perigo ambiental (Figura 42).



**Figura 42. Comparação entre concentração de clorofila e eficiência global fotossintética.**

Análise de Variância em Variantes Kruskal-Wallis.  $H = 7,812$  com 2 graus de liberdade.  $P$  (est.) = 0,020  $P$  (exato) = 0,011. As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado por acaso; há uma diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,011$ ).

A EGF apresenta variações nas amostras de efluentes brutos, aparentando ter uma correlação direta entre a concentração de clorofila e EGF de cada laboratório, exceto para o de hormônios, no qual a provável ação antioxidante atribuída a estrutura esteroidal dos hormônios favorece a transferência de elétrons e contribui para melhoria da EFG (STYCER, 1995; apud PINTO, 2017).

A EFG foi influenciada pela presença dos CODs em todos os laboratórios sendo o de hormônio o que apresentou menor valor na presença de CODs e maior diferença entre as eficiências encontradas na exposição a efluente bruto e tratado. A atividade antioxidante dos hormônios garantiu um bom desempenho da EFG. A queda na EFG pós ozonização se deve a decomposição do hormônio e do seu potencial antioxidante, e pela possível formação de etilenos que afetam a atividade da clorofila (STREIT et al., 2005), conforme já visto o item 7.3.2.

Com relação aos Laboratórios de Sólidos e Psicotrpicos, os comportamentos de redução da EGF se deve a presença de substâncias que atuam sobre potencias de ação, listadas na produção de ambos os laboratórios. Essas alterações podem influenciar na capacidade da alga se mover, sendo um fator extra na redução da EGF, ou tal redução ser apenas atribuída a redução da concentração de clorofila.

Tais mecanismos talvez sejam impedidos pela ação sobre potencial de ação celular atribuída a medicamentos manipulados nesses laboratórios, que afetariam a mobilidade do flagelo da alga. (GOODMAN; GILMAN, 2012).

## 6 CONCLUSÕES

Partindo-se do princípio de conhecer as alterações dos Interferentes Endócrinos (IEs) em estudo, bem como dos compostos originados de sua degradação química (CODs) no nível trófico primário – aqui representado pelas *E. gracilis* – objetivando avaliar a existência de risco ou perigo ambiental significativos e não conhecidos; a hipótese de que “*Não haveria ocorrência de alterações de perigo ambiental promovidos pela presença de IEs mas haveria piora de tais condições quando os IEs são submetidos a remoção química com geração de CODs*” acabou sendo a que se mostrou verdadeira pós experimentos.

Evidenciou-se assim que, não é somente a remoção química da atividade original do IE que deve ser considerada, mas também seus subprodutos pós processo químico empregado.

Na perspectiva de inovar os biotestes, e considerando a importância do nível trófico primário e as características que as *E. gracilis* – representante deste nível – apresentam, a exploração as alterações de características comportamentais e energética na presença do IE e dos CODs formados não apresentaram um risco de ecotoxicidade aguda para algas, mas as presenças de etilenos levaram a alterações na concentração de “clorofila a” e na EGF, sendo estes dois fatores correlacionados entre si.

Os experimentos demonstraram que os CODs formados têm potencial em longo prazo de influenciar sobre a longevidade da alga e a até mesmo comprometer o fornecimento de oxigênio, sendo esta uma de suas atribuições de grande relevância nos meios onde elas se encontram. Ressalta-se que este efeito foi atribuído aos CODs de outros laboratórios não sendo exclusivo do LMH, entretanto este laboratório foi o que mais causou redução da concentração com menor proporção produzida quando comparado com os demais laboratórios.

Fica por fim a questão de que a poluição emergente merece ser sim estuada a fundo, bem como suas ações e consequências no meio ambiente, de modo diferente como no passado onde não se creditava risco devido a dosagem ser considerada abaixo da concentração comumente considerada tóxica. O advento de estudos que envolveram a biomagnificação de efeitos trouxe essa realidade de risco. É correto que se tenha que buscar meios de eliminar esses compostos dos recursos hídricos, mas não se pode cometer o mesmo erro ignorando o que os compostos originados podem causar no meio ambiente, para que no futuro não se tenha que rever processos criados com o intuito de gerar benefícios, mas limitados por gerarem efeitos secundários de risco.

Por esta razão que os efeitos secundários atribuídos aos CODs devem ser parte integrante dessas pesquisas envolvendo remoção química de IEs e outros poluentes emergentes.

A variação do comportamento das algas, frente à exposição de diferentes de poluentes, demonstra que existe a necessidade de distinguir o tratamento dos efluentes, conforme as características das substâncias manipuladas em cada laboratório, a fim de reduzir o perigo de toxicidade ambiental.

Sendo assim, os dados de biomonitoramento encontrados foram importantes para que se tenha maior conhecimento e conscientização do problema, indicando a possibilidade que a toxicidade ambiental causada por efluentes advindos de farmácias magistrais, podem gerar grande impacto ao meio ambiente se não forem realizadas revisões de condutas e legislações que em longo prazo minimizem questões ambientais relacionadas à esta classe de poluentes emergentes.

## REFERENCIAS

AHMED, M. J., e B. H. Hameed. "Removal of Emerging Pharmaceutical Contaminants by Adsorption in a Fixed-Bed Column: A Review". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 149, março de 2018, p. 257–66. Crossref, doi:10.1016/j.ecoenv.2017.12.012.

ALVES, C.; FLORES, L. C.; CERQUEIRA, T. S.; TORALLES, M. B. P. Exposição ambiental a interferentes endócrinos com atividade estrogênica e sua associação com distúrbios puberais em crianças. **Cad. Saúde Pública**, v. 23, n. 5, p. 1005-1014, 2007.

AQUINO, S. F. DE; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. DE L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 18, n. 3, p. 187–204, 2013.

ARAÚJO, A. N.; FACHINI, A.; PENA, A.; DELERUE-MATOS, C.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, n. 1-3, p. 45-95, 2010.

ARAÚJO, K.; NEVES, M.; SÁ, M.; SILVA, L.; BRITO, N. Fármacos residuais: um problema de caráter ambiental. In: **Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de educação tecnológica, 5., 2010**, Maceió, AL. Anais... Maceió: Instituto Federal de Alagoas, 2010.

ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBUQUERQUE C.; INACIO A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; MUGNAL, R.; BAPTISTA, D. F. Utilização dos bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.12, n. 1, p. 61-72, 2007.

ARONSSON, K. A.; ECKELUND, N. G. A. Effects on motile factors and cell growth of *E. gracilis* after exposure to wood ash solution: assessment of toxicity, nutrient, availability and pH-dependency. **Water, Air and Soil Pollution**, v.162, p. 353-368, 2005.

AYANDA, O. S.; OLUTONA, G. O.; OLUMAYEDE, E. G.; AKINTAYO, C. O.; XIMBA, B. J. **Phenols, flame retardants and phthalates in water and wastewater: a global problem**. v. 74, n. 5. 2016.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. São Paulo: Intertox, 2003.

BARONTI, Chiara; CURINI, Roberta; D'ASCENZO, Giuseppe; DI CORCIA, Antonio; GENTILI, Alessandra; SAMPERI, Roberto. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. **Environmental Science & Technology**, v. 34, n. 24, p. 5059-5066, 2000.

BELSHE, E. F.; DURAKO, M. J.; BLUM, J. E. Photosynthetic Rapid Light Curves (RLC) of *Thalassia Testudinum* exhibit Diurnal Variation. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 342, p. 253-268, 2007.

BILA, D. M. **Degradação e Remoção da Atividade Estrogênica do Desregulador Endócrino 17 $\beta$ -Estradiol pelo Processo de Ozonização**, Tese de Doutorado, UFRJ/COPPE, 2005.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. **Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências**. Quim. Nova. 2007, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M.; **Fármacos no Meio Ambiente**. Quím. Nova, São Paulo, v. 26, n. 4, Aug.; 2003.

BILA, Daniele Maia. **Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17 $\beta$  – estradiol pelo processo de ozonização**. [Tese de Doutorado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2005.

BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R.; ÖQUIST, G. **Chlorophyll Fluorescence as a tool in photosynthesis research. In Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual** (D. Hall, J.M.O. Scurlock, H.R.R. Bolhâr-Nordenkampf, C.R.C. Leegood, S.P. Long, eds.) Chapman & Hall, London, p.193-206, 1993.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Anvisa e ABDI discutem descarte de resíduos de medicamentos. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu+noticias+anos/2012+noticias/anvisa+e+abdi+discute+m+descarte+de+residuos+de+medicamentos>> . Acesso em: 10 jul. 2014.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Anvisa e ABDI discutem descarte de resíduos de medicamentos. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu+noticias+anos/2012+noticias/anvisa+e+abdi+discutem+descarte+de+residuos+de+medicamentos>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

BRASIL. **Lei N° 12.305, de 2 de agosto de 2010**. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei no 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. Brasília, DF, 2010. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2010/lei/112305.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/112305.htm)>. Acesso em: 10 jul. 2014.

BRASIL. **Lei N° 9.433, de 8 de janeiro de 1997**. Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, regulamenta o inciso XIX do art. 21 da Constituição Federal, e altera o art. 1° da Lei nº 8.001, de 13 de março de 1990, que modificou a Lei nº 7.990, de 28 de dezembro de 1989. Brasília, DF, 1997. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/19433.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19433.htm)>. Acesso em: 10 jul. 2014.

BRASIL. **Lei N° 9.433, de 8 de janeiro de 1997.** Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, regulamenta o inciso XIX do art. 21 da Constituição Federal, e altera o art. 1° da Lei n° 8.001, de 13 de março de 1990, que modificou a Lei n° 7.990, de 28 de dezembro de 1989. Brasília, DF, 1997. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/19433.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19433.htm)>. Acesso em: 10 jul. 2014.

BRASIL. **Lei N° 9.605, de 12 de fevereiro de 1998.** Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. Brasília, DF, 1998. Disponível em <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/19605.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19605.htm)>. Acesso em: 11 jul. 2014.

CASTRO, Carmen Maria de. Perturbadores Endócrinos Ambientais: uma questão a ser discutida. **Engenharia Ambiental e Sanitária**, v. 7, n. 1-2, p. 4-5, 2002.

CAVALIERI, Ercole; FRENKEL, Krystyna; LIEHR, Joachim; ROY, Deodutta. Estrogens as Endogenous Genotoxic Agents—DNA Adducts and Mutations. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, v. 27, p. 75-93, 2000.

CHECCUCI, A.; COLOMBETTI, G.; FERRARA, R.; LENCI, F. Action spectra for photoaccumulation of green and colorless Euglena: evidence for identification os receptor pigments. **Photochem. Photobiol.** v. 23, p. 51-54, 1976.

CORDEIRO, D. **Uso de bioindicador de efeito endócrino e validação do método para determinação de hormônios na água da represa municipal de São José.** Dissertação de mestrado. Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo. São Carlos, 2007.

CRUZ, L. H. Degradação fotocatalítica de Sulfametoxazol, Trimetropina e Diclofenaco em solução aquosa. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1270-1274, 2010.

D'ASCENZO, G.; DI CORCIA, A.; GENTILI, A.; MANCINI, R.; MASTROPASQUA, R.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R. Fate of Natural Estrogen Conjugates in Municipal Sewage Transport and Treatment Facilitis, **The Science of the Total Environment**, v. 302, p. 199-209, 2003.

DALLEGRAVE, Alexsandro. **Determinação de hormônios estrógenos e progestágenos em amostras ambientais por CG-MS.** [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2012.

DALMÁZIO, Ilza. **Aplicação da espectrometria de massa com ionização electrospray no monitoramento de processos oxidativos avançados de interesse ambiental:** degradação de fármacos, avaliação de sistemas oxidativos e oxidação do isopreno [Tese]. Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte; 2007.

DE BARROS, André Luis Correa, et al. “Determination of Nine Pharmaceutical Active Compounds in Surface Waters from Paraopeba River Basin in Brazil by LTPE-HPLC-ESI-

MS/MS". *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 25, no 20, julho de 2018, p. 19962–74. Crossref, doi:10.1007/s11356-018-2123-y.

DESBROW, C.; Routledge, E. J.; Brighty, G. C.; Sumpter, J. P.; Waldock, M.; The selective estrogen receptor modulator raloxifene inhibits neutrophil extracellular trap formation *Technol.* 2005, 32, 1549.

DOMÈNECH, X.; JARDIM, W. F.; LITTER, M. I. **Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes.** Eliminación de contaminantes por fotocatalisis heterogênea. La Plata: Rede CYTED, 2001. Cap . 1., 2004.

EKELUND, N. G. A., NILSSON, L. Effects of estrogenic substances on the movement of *E. gracilis* Verh. **Internat. Verein. Limnol**, v. 30, Part. 2, Stuttgart, April, 2008.

ELEY, J.G.; BIRNE, C. Retention of Compounding skills among pharmacy students. **Am J Pharm**, v.70, n. 6, p 1-5, 2006.

ERZINGER, G. S. Produção **Biotecnológica de Sorbitol e Ácido Glucônico por *Zymomonas mobilis* ATCC29191**: Estudo da Estabilidade da Enzima Glicose-Frutose Oxidorredutase [Tese de Doutorado]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2004.

ERZINGER, G. S.; DEL Ciampo; HÄDER, D. P. **Equipamento e Processo para Análise de Toxicidade em Sistemas Aquáticos.** Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI, N°.0000221105523696. 2011.

ESPUGLAS, S.; BILA, D. M.; KRAUSE, L. G. T.; DEZOTTI, M. Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. **Journal of Hazardous Materials**, v. 149, p. 631-642, 2007.

FERNANDES, A. N *et al.* Remoção dos hormônios 17 $\beta$ -estradiol e 17 $\alpha$ -etinilestradiol de soluções aquosas empregando turfa decomposta como material adsorvente. **Quím. Nova** [online], v. 34, n. 9, p. 1526-1533, 2011. ISSN 0100-4042.

FERREIRA, M. G. M. **Remoção da Atividade Estrogênica de 17 $\beta$ -Estradiol e de 17 $\alpha$ -Etinilestradiol pelos Processos de Ozonização e O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Doutorado de Engenharia Química, Rio de Janeiro; 2008.

FILHO, R. W. R.; SANTOS, R. L.; VIEIRA, E. M. Poluentes emergentes como desreguladores endócrinos. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 2, n. 3, p. 283-288, 2007.

FONTENELE, Eveline Gadelha Pereira; MARTINS, Manoel Ricardo Alves; QUIDUTE, Ana Rosa Pinto; MONTENEGRO JÚNIOR, Renan Magalhães. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos, **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 54, n. 1, p. 6-16, 2010.

FREIRE, R. S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L. T. **Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds**. *Talanta*, v. 54, n. 4, p. 681-686, 2001.

FUJITA, T.; JAMES, C.; HIDEO, T.; Effects of reactive oxygen species on  $\alpha$ -tocopherol production in mitochondria and chloroplasts of *E. gracilis*. **J Appl Phycol**, v. 21, p. 185-191, 2008.

GOODMAN & GILMAN: **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

HÄDER, D. P.; LEBERT, M. Real time computer controlled tracking of motile microorganisms. **Pubmed – indexado por Medline**, v. 42, p. 509-514, 1985.

HÄDER, D.; AZIZULLAH, A., RICHTER, P., JAMIL, Chronic toxicity of a laundry detergent to the freshwater flagellate *E. gracilis*. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 7, p. 1957-1964, 2012.

HÄDER, D-P., LEBERT, M. **Real time computer controlled tracking of motile microorganisms**. **Photochemistry and Photobiology**, v. 42, p. 509-514, 1985.

HEATON, J. W.; MARANGONI, A. G. Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. **Trends in Foods Science & Technology**, v.7, p. 8-15, 1996.

IRMAK, S.; ERBATUR, O.; AKGERMAN, A. Degradation of 17 $\beta$ -estradiol and bisphenol A in aqueous medium by using ozone and ozone/UV techniques. **Journal of Hazardous Materials**, v. 126, p. 54-62, 2005.

JOBLING, Susan; NOLAN, Monique; TYLER, Charles; BRIGHTY, Geoff; SUMPTER, Jonh P. Widespread sexual disruption in wild fish. **Enviromental Science & Technology**, v. 32, n. 17, p. 2498-2506, 1998.

KOCK-SCHULMEYER, M.; GINEBREDA, A.; POSTIGO, C.; LOPEZ-SERNA, R.; PEREZ, S.; BRIX, R.; LLORCA, M.; LOPEZ DE ALDA, M.; PETROVIC, M.; MUNNÉ, A.; TIRAPU, L. **Wastewater reuse in Mediterranean semi-arid areas: The impact of discharges of tertiary treated sewage on the load of polar micro pollutants in the Llobregat river (NE Spain)**. *Chemosphere*, v. 82, p. 670-678, 2011.

KRAUSE, E.G.H., WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, v. 42, p. 313-349, 1991.

KUNKEL, U.; RADKE, M. Fate of pharmaceuticals in rivers: Deriving a benchmark dataset at favorable attenuation conditions. **Water Res.**, v. 46, n. 17, p. 5551–5565, 2012.

LANGSCH, L. A. I.; PINTO, L. H. **Avaliação da eficiência do processo de remoção de 17 $\beta$  – estradiol usando ozônio e UV e da toxicidade dos resíduos gerados**. Trabalho de

Conclusão de Curso (Engenharia Química). Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE. Joinville, SC, 2016

LEMKE, Thomas L.; WILLIAMS, David A.; ROCHE, Victoria F. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 7. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.

LIBARDI JUNIOR, N. **Estudo de lacases fúngicas para degradação de compostos interferentes endócrinos**. Dissertação (Engenharia de Processos) – Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2010.

LIEHR, J. G.; ROY, D.; ARI-ULUBELEN, A.; BUI Q. D.; WEISZ, J.; STROBEL, H. W. Effect of chronic estrogen treatment of Syrian hamsters on microsomal enzymes mediating formation of catecholestrogens and their redox cycling: implications for carcinogenesis. **J Steroid Biochem**, v. 35, n. 5, p. 555-60, Apr. 2008.

LOPEZ-SERNA, R., PETROVIC, M., BARCELO, D.; **Occurrence and distribution of multi-class pharmaceuticals and their active metabolites and transformation products in the Ebro river basin (NE Spain)**. *Sci. Total Environ.* **440**, p. 280–289, 2012.

MANIERO M. G.; BILA D. M.; DEZOTTI M. 2008. Degradation and estrogenic activity removal of 17  $\beta$ - estradiol and 17  $\alpha$ -ethinylestradiol by ozonation and  $O_3/H_2O_2$ . **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 105-115, 2008.

MARTINS W. Energy metabolism among eukaryotic anaerobes in light of Proterozoic ocean chemistry. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 363, p. 2717–2729, 2008.

MELO, A. S. P. **Planejamento e controle da produção em farmácia com manipulação: estudo de caso em instituição pública**. 2009. 105 f. Dissertação (Mestrado em Sistemas de Gestão) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2009. Disponível em: <[http://www.bdttd.ndc.uff.br/tde\\_arquivos/14/TDE-2009-12-03T105554Z-2297/Publico/Dissertacao%20%20Adriana%20%20Melo.pdf](http://www.bdttd.ndc.uff.br/tde_arquivos/14/TDE-2009-12-03T105554Z-2297/Publico/Dissertacao%20%20Adriana%20%20Melo.pdf)>. Acesso em: 16 jul. 2014.

MILLS, M. R.; ARIAS-SALAZAR, K.; BAYNES, A.; SHEN, L. Q.; CHURCHLEY, J.; BERESFORD, N.; GAYATHRI, C.; GIL, R. R.; KANDA, R.; JOBLING, S.; COLLINS, T. J. **Removal of ecotoxicity of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol using TAML/peroxide water treatment**. v. 12; n. 5. jun. 2015.

MORAIS, Ruiter L., et al. “Removal of synthetic sex hormones by hydrothermal carbonization”. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, vol. 90, no 2, maio de 2018, p. 1327–36. Crossref, doi:10.1590/0001-3765201820170176.

MUNNÉ-BOSCH, Sergi; ALEGRE, Leonor. The function of tocopherols and tocotrienols in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, n. 1, p. 31-57, 2010.

MUNTER, R. Advanced oxidation processes: current status and prospects. **Proc. Estonian Acad. Sci., Chem.**, v. 50, n. 2, p. 59-80, 2001.

MUNTER, REIN. Advanced Oxidation Processes: Current Status and Prospects. **Proceedings of the Estonian Academy of Sciences**, v. 50, n. 2, p. 59-80, 2001.

NIELSEN, H. D.; NIELSEN, S. L. Evaluation of imaging and conventional PAM as a measure of photosynthesis in thin-and thick-leaved marine macroalgae. **Aquat Biol.**, v. 3, p. 121-131, 2008.

OGA, Seizi; CAMARGO, Márcia Maria de Almeida; BATISTUZZO, José Antonio de Oliveira. **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu Editora; 2008.

OSAFUNE, T.; SUMIDA, S. Physiological events occurring during the conversion from heterotrophy to autotrophy in *E. gracilis*. **Bull Nippon Sport Sci. Univ.**, v. 36, p. 137-147, 2006.

PACHECO, José Ricardo. **Avaliação de um sistema de ozonização baseado em coluna de borbulhamento**. [Dissertação de Mestrado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2012.

PEREIRA, Renato de Oliveira; CARMINATO, Vivian Maria; VIEIRA, Eny Maria; DANIEL, Luiz Antonio. Degradação parcial de 17 $\beta$ -estradiol por cloração aplicada ao tratamento de água. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 18, n. 3, p. 215-222, 2013.

PINTO L. H.; CARDOZO G.; SOARES J. C.; ERZINGER, G. S.; Toxicidade ambiental de efluentes advindo de diferentes laboratórios de uma farmácia magistral. **Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 1761, 09 jul. 2016.

PINTO L. H.; CARDOZO, G.; SOARES, J. C.; ERZINGER, G. Toxicidade ambiental de efluentes advindo de diferentes laboratórios de uma farmácia magistral. **Rev. Ambient. Água, Taubaté**, v. 11, n. 4, p. 819-832, dez. 2016.

PINTO L. H.; KRUGER, V.; STEINBACH, H.; SCHULTER, L. S.; SIERTH, R.; CIAMPO, L.; ENZIGER, G. S. Avaliação do risco de potencial ecotoxicológico de resíduos de 17 $\beta$  estradiol obtidos pós-processo oxidativo a base de peróxido de hidrogênio. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, p. 435, 2014.

PINTO, Luciano Henrique, et al. Alterações no comportamento das algas *E. gracilis* na presença de 17 $\alpha$  etinilestradiol e 17  $\beta$  estradiol. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 20, n. 2, jun. 2017.

PIRES, Janaina. **Avaliação do processo oxidativo avançado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na remoção do hormônio 17- $\beta$ -estradiol presente em efluente de produção de medicamentos hormonais de uso veterinário**. [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto: Universidade de Ribeirão Preto; 2009.

PIRES, K. M. S.; ALENCAR, D. B. de; SOUSA, M. B. de; SAMPAIO, A. H.; SAKER-SAMPAIO, S. Teores de  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno em macroalgas marinhas desidratadas. **Revista de Ciência Agronômica, Fortaleza**, v. 39, n. 2, p. 257-262, abr./jun., 2008.

PLEKHANOV, S. E.; CHEMERIS, Y. K. Early effect of sodium pentachlorophenate on photosynthetic activity of the alga *Chlorella Pyrenoidosa* Chick. S-39. **Plant Physiol**, v. 35, p. 248-254, 2008.

PORRA, R. J. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. **Photosynthesis Research**, v.73, n.1-3, p.149-156, 2002.

REIS FILHO, RICARDO WAGNER; ARAÚJO, JULIANA COUTINHO DE; VIEIRA, ENY MARIA. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 817-822, 2006.

REVIERS, B. de. **Biologia e Filogenia das Algas**. Porto Alegre: Artmed, 2006. 280p.

SANTOS, L.; ARAÚJO, A. N.; FACHINI, A.; PENA, A.; DELERUE-MATOS, C.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, p. 45-95, 2010.

SCHINDLER, Mirjam, e Geoffrey Caruso. “Emerging Urban Form – Emerging Pollution: Modelling Endogenous Health and Environmental Effects of Traffic on Residential Choice”. *Environment and Planning B: Urban Analytics and City Science*, junho de 2018, p. 239980831878320. Crossref, doi:10.1177/2399808318783206.ADAK, Asok; PAL, Anjali. Removal of phenol from aquatic environment by SDS-modified alumina: Batch and fixed bed studies. **Separation and Purification Technology**, v. 50, n. 2, p. 256-262, 2006.

SHI, W.; WANG, L.; ROUSSEAU, D. P.; LENS P. N. Removal of estrone, 17 $\alpha$ -ethinyloestradiol, and 17 $\beta$ -estradiol in algae and duckweed-based wastewater treatment systems. **Environ Sci Pollut Res Int.**, v. 17, n. 4, p. 824-33, May. 2010. doi: 10.1007/s11356-010-0301-7.

SILVA, R. F. da; NASCIMENTO FILHO, A. P.; MENDONÇA, D. C. **Estratégias competitivas no mercado farmacêutico brasileiro; uma abordagem sobre o setor magistral**. Trabalho apresentado ao 8º SIMPEP. Brasil, Bauru, 2006.

SNYDER, S. A.; WESTERHOFF, P.; YOON, Y.; SEDLAK, D. Pharmaceuticals, Personal Care Products, and Endocrine Disruptors in Water: Implications for the Water Industry, **Environmental Engineering Science**, v. 20, n. 5, p. 449–469, 2003.

SOLOMON, G.; SCHETTLER, T. Environment and Health: 6. Endocrine Disruption and Potential Human Health Implications, **Canadian Medical Association Journal**, v. 163, n. 11, p. 1471-1476, 2000.

SOUZA, Brígida Prieto. **Avaliação da remoção de sulfametoxazol, diclofenaco e 17 $\beta$ -estradiol em água por meio de processo oxidativo com cloro.** [Dissertação de Mestrado]. Ilha Solteira: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2014.

STACEY, A.; MAOYUN, T.; RAVI, S. Estradiol-17 $\beta$  as an antioxidant: Some distinct features when compared with common fat-soluble antioxidants. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 128, n. 4, p. A1, October, 1996.

STREIT, N. et al., . **As clorofilas.** *Cienc. Rural*, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 748-755, June 2005.

STREIT, N.; et al. **As clorofilas.** *Cienc. Rural*, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 748-755, June 2005. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782005000300043&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782005000300043&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 09 nov. 2017.

SUMIDA, S.; LYMAN, H.; KIYOHARA, N.; OSAFUNE, T. Mechanism of Conversion from Heterotrophy to Autotrophy in *E. gracilis*. **Cytologia**, v. 72, n. 4, p. 447-457, 2007.

VALCÁRCEL, Y.; GONZÁLEZ ALONSO, S.; RODRIGUEZ-GIL, J. L.; ROMO, R.; GIL, A.; CATALÁ, M. Analysis of the presence of cardiovascular and analgesic/anti-inflammatory/antipyretic drugs in fluvial and drinking water of the Madrid Region in Spain. **Chemosphere**, v. 82, n. 7, p. 1062-1071, 2011.

VERLICCHI, P., AL AUKIDY, M., ZAMBELLO, E.; Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. **Sci. Total Environ.**, v. 429, p. 123–155, 2012.

WARING, R. H.; HARRIS, R. M. 2005. Endocrine disruptors: A human risk?, **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 244, p. 2–9, 2005.

WESTERHOFF, P.; YOON, Y.; SHYDER, S.; WERT, E. Fate of Endocrine-Disruptor, Pharmaceutical, and Personal Care Product Chemicals during Simulated Drinking Water Treatment Processes, **Environmental Science and Technology**, v. 39, p. 6649–6663, 2005.

ZAGATTO, Pedro A.; BERTOLETTI, Eduardo. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações.** 2. ed. São Carlos: Editora Rima; 2008.

ZANON, A. B. **Aspectos Teóricos e Práticos sobre a Avaliação da Estabilidade de Emulsões Manipuladas em Farmácia.** Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.

ZAPATA, Carlos Fernando Vergel. **Modelo simplificado para a transferência de massa no processo de ozonização em uma coluna de borbulhamento.** [Dissertação de Mestrado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 20012.

## AUTORIZAÇÃO

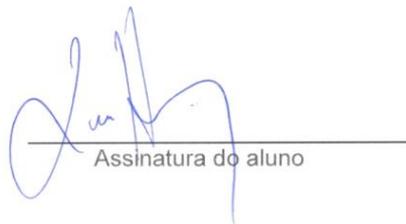
Nome do autor: Luciano Henrique Pinto

RG: 7116564

título da tese: **Avaliação do risco e perigo de toxicidade ambiental de efluentes originados de degradação de 17 $\beta$  estradiol e análogos por processo oxidativo avançado ozônio/uv por algas *E. gracilis***

Autorizo a Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, através da Biblioteca Universitária, disponibilizar cópias da tese de minha autoria.

Joinville, 13 de 06 de 2019.



Assinatura do aluno