

LUCIANO HENRIQUE PINTO

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA E
NO COMPORTAMENTO GERAL DAS ALGAS DO GÊNERO
Euglenas Gracilis NA PRESENÇA DOS HORMONIOS DE 17 α
ETINILESTRADIOL E 17 β ESTRADIOL**

**JOINVILLE - SC
2012.**

LUCIANO HENRIQUE PINTO

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA E
NO COMPORTAMENTO GERAL DAS ALGAS DO GÊNERO
Euglenas Gracilis NA PRESENÇA DOS HORMONIOS DE 17 α
ETINILESTRADIOL E 17 β ESTRADIOL**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville. Orientador: Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger.

**JOINVILLE – SC
2012.**

Termo de Aprovação

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA E NO COMPORTAMENTO GERAL DAS ALGAS DO GÊNERO *Euglenas Gracilis* NA PRESENÇA DOS HORMONIOS DE 17 α ETINILESTRADIOL E 17 β ESTRADIOL

Por

Luciano Henrique Pinto.

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, na área de concentração Biotecnologia e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente.

Data

DEDICATÓRIAS

Dedico este trabalho à memória de todos aqueles que mantiveram acesa a chama pela busca do saber ao longo das gerações, em especial, àqueles que mesmo diante de tantas dificuldades priorizaram esta busca.

Dedico a todos que acreditaram ser a busca pelo saber a melhor forma de libertar o espírito humano, e fazer deste lugar um mundo melhor.

Dedico aos meus pais e irmãos, pelo apoio incondicional dado ao meu desejo de estudar e buscar o conhecimento sempre.

Dedico ao meu filho Samuel, que ele mantenha sempre acesa esta inspiração pela busca do saber, e que descubra no futuro coisas que eu nem sequer consigo imaginar hoje.

Dedico a todos os professores que tive, pois sem eles não teria chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me inspirar sempre na busca do saber, do conhecimento e luta por um mundo melhor.

Agradeço aos meus pais, pelo apoio incondicional da minha decisão de sempre estudar.

Agradeço ao meu filho Samuel, por compreender os motivos pelo qual o pai esteve ausente, e que o cumprimento desta etapa seja exemplo para a sua vida futura.

Agradeço ao Departamento de Farmácia, pelo apoio nesta etapa, em especial a Prof. Dra. Bianca Ramos Pezzini que sempre me apoio nesta etapa.

Agradeço às alunas de TCC do laboratório de Fotoquímica, pela dedicação e empenho nas atividades propostas.

A Ecobabitonga, em especial ao Msc. Lineu Ciampo, pelo suporte nas atividades necessárias.

Agradeço ao professor Gilmar, pelas orientações e paciência quando esta foi requerida.

Agradecimento especial ao Dr, Sebastian M. Strauch, pelos esclarecimentos vindos da Alemanha nos momentos certos e mais que oportunos!

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE TABELAS/GRÁFICOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE SIGLAS

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	19
2.1 GERAL	19
2.1.2 ESPECÍFICOS	19
3. REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1.QUALIDADE AMBIENTAL: AVANÇOS TECNOLÓGICOS.....	20
3.2 POLUIÇÃO EMERGENTE DOS RECURSOS HÍDRICOS.....	21
3.2.1 DEFINIÇÃO DE POLUIÇÃO EMERGENTE.....	21
3.2.2 CENÁRIO ATUAL DA POLUIÇÃO EMERGENTE EM AMBIENTES AQUÁTICOS NO BRASIL.....	22
3.3. HORMÔNIOS 17 β -ESTRADIOL E 17 α -ETINILESTRADIOL COMO POLUIDORES EMERGENTES.....	23
3.3.1 HORMÔNIOS 17 β -ESTRADIOL E 17 α -ETINILESTRADIOL E	

A AÇÃO DESREGULADORA ENDÓCRINA.....	23
3.3.2 IMPACTOS DOS HORMÔNIOS 17 β -ESTRADIOL E 17 α - ETINILESTRADIOL NA SAÚDE HUMANA E NO MEIO AMBIENTE.....	25
3.3.3 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DOS HORMÔNIOS 17 β -ESTRADIOL E 17 α -ETINILESTRADIOL.....	25
3.3.3.1 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS.....	25
3.3.3.2 17 β -ESTRADIOL E 17 α -ETINILESTRADIOL E SUAS AÇÕES COMO ANTIOXIDANTES EM ORGANISMOS VIVOS.....	27
3.4. PROCESSOS QUÍMICOS PARA REMOÇÃO DE 17 β -ESTRADIOL E 17 α -ETINILESTRADIOL EM AMBIENTES AQUÁTICOS.....	28
3.5. BIOTESTES E SEU EMPREGO NA SAÚDE E MEIO AMBIENTE.....	29
3.5.1 USO DE ALGAS DO GÊNERO <i>Euglenas Gracilis</i> EM BIOTESTES ENVOLVENDO POLUENTES EMERGENTES.....	31
3.5.1.1 FISIOLOGIA DAS EUGLENAS GRACILIS.....	31
3.5.1.2 ATIVIDADES FOTOSSINTÉTICAS DAS EUGLENAS GRACILIS.....	32
3.6. AÇÕES DOS HORMÔNIOS 17 β -ESTRADIOL E 17 α - ETINILESTRADIOL SOBRE FISIOLOGIA DE <i>Euglenas gracilis</i>	34
3.7. BIOTESTES:.....	35
4. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	36
4.1. PROCEDIMENTOS E MÉTODOS.....	36

4.2. DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	36
4.3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.3.1 MICRO-ORGANISMOS E MANUTENÇÃO.....	37
4.3.2 SOLUÇÕES DE 17 β -ESTRADIOL E 17 α -ETINILESTRADIOL.....	37
4.3.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS A SEREM TESTADAS.....	37
4.3.4 PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA.....	39
4.3.4.1 CRONOGRAMA DOS TESTES AGUDOS QUE FORAM REALIZADOS.....	40
4.3.5 TESTE DE EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA NO PAM.....	41
4.3.5.1 MEDIÇÃO DE PARÂMETROS DE EFICIÊNCIA FOTOSSÍNTESE USANDO O EQUIPAMENTO PAM.....	41
4.4. AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS DAS ALGAS PELO BIOMONITORAMENTO VIA NG TOX.....	44
4.4.1 EXTRAÇÃO DA CLOROFILA.....	46
4.4.2 ANÁLISE DOS DADOS OBTIDOS.....	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	48
5.1. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA NA PRESENÇA DOS HORMÔNIOS.....	48
5.1.1 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA APÓS A ADIÇÃO.....	48
5.1.2 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA APÓS 1 HORA DA ADIÇÃO DOS HORMÔNIOS.....	48
5.1.3 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA APÓS 24 HORAS DA ADIÇÃO DOS HORMÔNIOS.....	50
5.1.4 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA APÓS 7 DIAS DA ADIÇÃO DOS HORMÔNIOS.....	52
5.1.5 MÉDIA DAS EFICIÊNCIAS DURANTE TODO O TRATAMENTO.....	54
5.2. AVALIAÇÃO DAS DISSIPAÇÕES NÃO FOTOQUÍMICAS QN E NPQ NA PRESENÇA	

DOS HORMÔNIOS.....	56
5.2.1 AVALIAÇÃO DAS DISSIPAÇÕES NÃO FOTOQUÍMICAS QN E NPQ LOGO APÓS A ADIÇÃO.....	56
5.2.2 AVALIAÇÃO DAS DISSIPAÇÕES NÃO FOTOQUÍMICAS QN E NPQ 1HORA APÓS A ADIÇÃO DOS HORMÔNIOS.....	56
5.2.3 AVALIAÇÃO DAS DISSIPAÇÕES NÃO FOTOQUÍMICAS QN E NPQ 24 HORAS DA ADIÇÃO DOS HORMÔNIOS.....	59
5.2.4 AVALIAÇÃO DAS DISSIPAÇÕES NÃO FOTOQUÍMICAS QN E NPQ 7 DIAS APÓS A ADIÇÃO DOS HORMÔNIOS.....	62
5.2.5 MÉDIA DAS EFICIÊNCIAS DURANTE TODO TRATAMENTO.....	63
6. EXTRAÇÃO DE CLOROFILA.....	65
6.1. DETERMINAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES DE CLOROFILA FRENTE À EXPOSIÇÃO DE HORMÔNIOS.....	66
6.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CAROTENOIDES FRENTE À EXPOSIÇÃO DE HORMÔNIOS.....	68
7. ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DAS ALGAS E. GRACILIS EM ENSAIO DE BIOMONITORAMENTO EM TEMPO REAL VIA NG TOX.....	70
7.1. ESTUDOS DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS FRENTE À PRESENÇA DE 17 α ETINIL ESTRADIOL E 17 β ESTRADIOL.....	70
7.1.1 ANÁLISE DA COMPACTAÇÃO DAS ALGAS.....	70
7.1.2 ANÁLISE DA VELOCIDADE MÉDIA DAS ALGAS.....	71
7.1.2.1 ANÁLISE DA VELOCIDADE MÉDIA DE SUBIDA À SUPERFÍCIE DAS ALGAS.....	73
7.1.2.2 ANÁLISE COMPARATIVA DOS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS ENTRE OS PERÍODOS.....	74
8. CONCLUSÕES.....	75

RESUMO

Atualmente, tem-se uma preocupação crescente quanto à contaminação dos recursos hídricos pelos “poluentes emergentes”. Desreguladores endócrinos (DE) advindos de produtos farmacêuticos, como o 17 α etinilestradiol e o 17 β estradiol se enquadram nesta condição. Tal assunto vem sendo pesquisado, pois pouco se conhece sobre o risco ecotoxicológico de tais compostos. Existem atualmente diversos métodos que visam fazer o biomonitoramento ambiental quanto à presença de DE nas águas, como os testes envolvendo peixes ou leveduras geneticamente modificadas. A desvantagem do primeiro está na demora e a do segundo, na impossibilidade de extrapolação para o meio ambiente por lidar com seres geneticamente modificados. Neste cenário, buscam-se biotestes que permitam um biomonitoramento rápido e ambientalmente válido. Alterações fisiológicas de micro-organismos frente a DE vêm sendo pesquisadas para a caracterização e uso em biomonitoramento. Este estudo objetivou conhecer as alterações na atividade fotossintética e comportamental de algas do gênero *Euglena gracilis* na presença de hormônios. Na presença de luz saturante, cultura de algas expostas a 17 β estradiol sofreram mudanças na atividade fotossintética, ocorrendo um aumento na dissipação não fotoquímica NPQ. A concentração de clorofila na presença de acetona teve um decréscimo na sua concentração, enquanto que na presença de 17 β estradiol solubilizado neste solvente houve um aumento significativo durante o período de 7 dias. As concentrações de carotenos também aumentaram na exposição a este hormônio. Tais resultados apontam para alterações que podem ser utilizadas para biomonitoramento ambiental.

PALAVRAS-CHAVE: Poluição emergente, estrogênio, alterações na fotossíntese, mudanças no comportamento

ABSTRACT

Currently there has been increasing concern about the contamination of water resources by "emerging pollutants". No regulator endocrine (ED) coming from pharmaceuticals, such as the 17α and 17β estradiol and ethinyl estradiol fall under this condition. This issue has been studied by researchers because little is known about the ecotoxicological risk of such compounds. There are currently several methods that aim to make the biomonitoring for the presence of ED waters, as tests involving genetically modified yeast or fish. The disadvantage lies in the first and second delay, the impossibility of extrapolate the environment for dealing with genetically modified beings. In this scenario, we seek to bioassays that allow a quick and environmentally biomonitoring valid. Physiological changes of microorganisms front ED have been widely studied for the characterization and use in biomonitoring. This study investigated the changes in photosynthetic activity and behavioral algae of the genus *Euglena Gracilis* in the presence of hormones previously dissolved in acetone and diluted in water. In the presence of saturating light, algae culture exposed to 17β estradiol suffered changes in photosynthetic activity, an increase in the dissipation occurring non-photochemical NPQ. The concentration of chlorophyll in the presence of acetone only had a decrease in concentration, while the presence of 17β estradiol solubilized in this solvent a significant increase over the 7 day period. The concentrations of carotene also increased the exposure to this hormone. These results point to changes that may be used for biomonitoring.

KEY WORDS: Emerging pollution, estrogen, changes in photosynthesis, changes in behavior

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Estrutura química do 17 α -Etinilestradiol e 17 β -Estradiol.....	26
FIGURA 2: Processo de degradação de compostos fenólicos.....	29
FIGURA 3: Mecanismo de dissipação de energia na forma de calor.....	34
FIGURA 4: Etapas de preparo da solução de hormônios em acetona.....	38
FIGURA 5: Etapas de preparação da solução aquosa dos hormônios.....	39
FIGURA 6: Esquema de preparo das culturas de <i>E. Gracilis</i> para o teste.....	40
FIGURA 7: Cronograma de Análises.....	41
FIGURA 8: Emissão dos pulsos de luz saturante.....	42
FIGURA 9: Foto do equipamento.....	43
FIGURA 10: Esquema de Funcionamento do NG Tox.....	45
FIGURA 11: Imagem do software que analisa as algas em tempo real.....	45
FIGURA 12: Processo de filtração para extração da clorofila.....	47

LISTA DE TABELAS/GRÁFICOS

GRÁFICO 1	47
GRÁFICO 2	48
GRÁFICO 3	49
GRÁFICO 4.....	50
GRÁFICO 5.....	51
GRÁFICO 6	52
GRÁFICO 7	53
GRÁFICO 8	54
GRÁFICO 9.....	56
GRÁFICO 10.....	57
GRÁFICO 11.....	58
GRÁFICO 12.....	59
GRÁFICO 13.....	60
GRÁFICO 14.....	62
GRÁFICO 15.....	63
GRÁFICO 16.....	65
GRÁFICO 17.....	67
GRÁFICO 18.....	69

GRÁFICO 19.....	69
GRÁFICO 20.....	70
GRÁFICO 21.....	71
GRÁFICO 22.....	71/72
GRÁFICO 23.....	72
GRÁFICO 24.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas.

AFNOR – *Association Française de Normalization*.

ANOVA – Técnica univariada que trata dados quantitativos em relação a uma variável independente categórica de três níveis.

ASTM – *American Society for Testing and Materials*.

CCD – *Charged coupled device*.

CPRG – Substrato cromogênico.

DES – Desreguladores endócrinos

DIN - *Deutsches Institute für Normung*.

EPA – Agência de proteção Ambiental do Norte da América.

ERO – Espécies reativas de oxigênio

ETR – Taxa de Transporte de Elétrons.

ETE – Estação de tratamento de água

EU – União Europeia.

IBAMA – Instituto Brasileiro de Meio Ambiente.

IN LOCO – No local.

IN VITRO – Processos biológicos que têm lugar fora dos sistemas vivos.

ISO - *International Organization for Standardization*.

NG TOX – New Generation Toxicology - Ferramenta de biomonitoramento em tempo real.

NPQ – Dissipação Não fotoquímica de Stern Volmer

OMS – Organização Mundial da Saúde.

PAM – Pulse Amplification Modulation – Fluorímetro de amplitude de pulso modulada

pH – Potencial de hidrogênio iônico.

POA – Processos Oxidativos Avançados.

QN – Dissipação Não Fotoquímica de energia

VTG – Vitelogenina.

ZR – Zona radiata.

YIELD – Eficiência fotossintética

1. INTRODUÇÃO

Existe, atualmente, uma preocupação crescente quanto à contaminação dos recursos hídricos pelos denominados “poluentes emergentes”. (VALCÁRCEL *et al.*, 2011), dentre os quais podem se destacar os advindos de produtos farmacêuticos - como resíduos de medicamentos e seus derivados. Tal situação vem chamando a atenção de pesquisadores, pois ainda se desconhece o potencial ecotoxicológico de tais produtos. Estes poluentes são encontrados em pequenas quantidades no meio ambiente, o que em princípio não traria complicações imediatas à saúde humana, mas o risco ambiental e as complicações para a saúde humana durante uma exposição crônica precisam ser mais bem avaliados. (KOCK – SCHULMEYER *et al.*, 2011). Tal discussão merece atenção especial porque são escassos, ou, praticamente inexistentes os métodos que removam esses poluentes, sendo as pesquisas nestes campos ainda incipientes, porém promissoras.

Um dos compostos que se enquadra como poluente emergente são os estrógenos e seus derivados, como o 17α etinilestradiol e o 17β estradiol. . Estes hormônios são encontrados nos recursos hídricos em concentrações mínimas, na escala de nanogramas, o que de imediato não representaria riscos à saúde e ao meio ambiente. Entretanto, a exposição crônica causa à feminilização de peixes , e o consumo de águas contaminadas que estes hormônios acarreta desequilíbrio endócrino resultando em riscos de desenvolvimento de câncer de colo uterino e de mama em mulheres, e câncer de próstata nos homens. (MANIERO *et al.*, 2008). Uma das ações atribuídas a esses hormônios corresponde a ação antioxidante nos organismos vivos que pode influenciar processos metabólicos já existentes (STACEY 1996).

A contaminação dos recursos hídricos por estrógenos e seus derivados vem sendo amplamente estudada (BILA *et al* 2007), e os esforços atuais se concentram na identificação e remoção química destes hormônios afim de se evitar a interação desses com os organismos vivos. O biomonitoramento quanto a toxicidade ambiental promovida pelo estrógeno, valendo-se do uso de biotestes vem sendo estudada devido à importância de se ter meios que permitam a elaboração de pareceres sobre a toxicidade ambiental aguda e crônica destes hormônios nos ambientes aquáticos.

Tem-se atualmente biotestes que avaliam a contaminação de recursos hídricos por estrógenos. A vitelogenina (VTG) e a proteína zona radiata (ZR) são compostos são normalmente encontrados em peixes do gênero feminino, porém que são expressas em peixes machos juvenis quando na presença de estrógenos. Tal condição indica a ocorrência de desequilíbrio hormonal nocivo a espécie. (CORDEIRO e VIEIRA, 2007). Este bioteste traz a vantagem de ser específico para a contaminação estrogênica, entretanto apresenta a desvantagem da demora na obtenção da resposta, e um elevado custo na sua execução. Tal método ainda requer autorização prévia do IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente), além de seguir protocolos de proteção animal, o que torna o procedimento ainda mais dificultoso.

O uso do gene receptor de estrogênio humano integrado ao genoma de uma levedura vem sendo utilizado em experimentos *in vitro*. No interior da levedura ocorre a ativação do receptor pelo estrogênio, expressando o gene receptor da Lac-Z que produz a enzima β -galactosidase. Esta enzima metaboliza o substrato cromogênico CPRG - normalmente amarelo - formando um produto vermelho. e Essa mudança de coloração é medida pela absorbância. A desvantagem deste

método reside no fato da impossibilidade de extrapolação dos resultados para a questão ambiental, pois trata-se de um micro-organismo não existente na natureza.

Com a necessidade de se ter biotestes ágeis e de fácil manuseio, estudos nesta área se torna cada vez mais comuns. Mas para credenciar um micro-organismo para uso em biotestes específicos, o mesmo deve ser amplamente estudado, elencando claramente às alterações que ocorrem frente à exposição ao contaminante estudado. Um dos propósitos deste trabalho é investigar as alterações que podem acontecer com as algas do gênero *Euglena gracilis*, e verificar sua possibilidade de uso em biotestes controlados que possibilitem avaliar questões relativas aos processos de remoção química de estrógenos, com ênfase a toxicidade ambiental dos hormônios e resíduos gerados nos processos de remoção.

O micro-organismo *Euglena gracilis* - alga unicelular, flagelada, fototrófica e que utiliza diversas fontes de carbono para suas atividades - apresenta parâmetros fisiológicos claros que podem ser afetados na presença de diversos contaminantes. Estes parâmetros são: motilidade, velocidade, velocidade de subida e compactação, dentre outros. (MARTINS 2008). Outro parâmetro útil também é a atividade fotossintética que estas algas exercem. Tais condições a elegem como candidata a bioteste para hormônios.

O problema estudado neste trabalho reside então na avaliação de possíveis alterações que ocorrem com estes micro-organismos na presença de 17α etinilestradiol e 17β estradiol, visando credenciar este gênero de algas quanto à possibilidade ou não de uso em biotestes de alcance ambiental em trabalhos futuros, seja para a avaliação de amostras com suspeita de contaminação por estes hormônios, seja como marcador de eficiência para processos químicos destinados a remoção de estrógenos, bem como a avaliação de riscos de toxicidade ambiental

residual dos produtos residuais originados a partir da remoção química do estrógeno e seus derivados.

A hipótese trabalhada nesta dissertação foi que as ações antioxidantes dos hormônios estradiol podem influenciar o processo fotossintético, levando talvez a um aumento na concentração de carotenoides, e que as propriedades químicas dos hormônios, como a sua lipofilia, podem fazer com que estes compostos fiquem armazenados no interior da alga influenciando de alguma maneira no comportamento da *E. gracilis*. Tais alterações podem levar a toxicidade ou a mudanças que podem ser úteis no biomonitoramento ou no uso destas algas em testes que envolvam a remoção de estrógenos por processos químicos.

2. OBJETIVOS:

2.1 - OBJETIVO GERAL:

Avaliar a influência que os hormônios 17 α etinilestradiol e 17 β estradiol exercem no comportamento, parâmetros fisiológicos e na atividade fotossintética de algas do gênero *E. Gracilis*.

2.1.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a influência que os hormônios 17 α etinilestradiol e 17 β estradiol exercem na atividade fotossintética, comparando seus resultados com os encontrados no controle e meio contendo apenas solvente destes hormônios;
- Avaliar, dentre os hormônios estudados, qual aquele que exerce efeito mais significativo sobre a atividade fotossintética das algas *E. Gracilis*;
- Verificar se os hormônios em teste exercem alguma atividade antioxidante que influencie na atividade fotossintética;
- Verificar se os hormônios influenciam sobre a concentração de clorofila presente nas algas, bem como a formação de carotenos;
- Avaliar se há alguma alteração significativa sobre comportamentos de mobilidade, velocidade, velocidade subida a superfície e compactação celular na presença dos hormônios.

3. REFERENCIAL TEÓRICO.

3.1 - QUALIDADE AMBIENTAL DOS AMBIENTES AQUÁTICOS: AVANÇOS TECNOLÓGICOS, CONSUMO E IMPACTO AMBIENTAL.

A qualidade ambiental necessária à vida, assim como a recuperação e promoção desta qualidade vem sendo amplamente debatida. Os avanços tecnológicos, bem como as mudanças ocorridas em nossa sociedade, com o advento da modernidade e pós-modernidade vêm transformando a maneira de como o homem se relaciona com o meio em que vive. Este meio, constituído por elementos naturais e sociais, que interagem de forma dinâmica, encontra-se em contínuo processo de interação com a realidade, sendo assim capaz de construir processos culturais, tecnológicos, históricos ou sociais que transformam o meio naturalmente construído (REIGOTA 2002). Tal transformação pode criar um meio mais favorável à vida, ou, como acontece na maioria das vezes, um ambiente inadequado e até mesmo impróprio à vida do homem e das demais espécies de seres vivos. Boa parte das transformações inadequadas vem da produção de resíduos nocivos ao meio ambiente, descartados em diversos locais, dos quais não somente o seu descarte adequado deve ser debatido, mas também o que fazer nos casos de contaminações já instaladas em diversos ambientes habitados por seres vivos. Boa parte da degradação ambiental acontece devido ao conflito existente entre os interesses capitalistas — focados no consumo, e a necessidade de conservação, preservação e recuperação do meio em que se vive. Tais discrepâncias de visões apontaram para a criação do conceito de Desenvolvimento Sustentável, conceito este que se apoia na premissa de que um desenvolvimento econômico e social não deve ocorrer de forma a comprometer as necessidades das futuras gerações (REIGOTA, 2002).

Neste contexto surgem novas formas de conhecimento, como a ecotoxicologia, definida como uma ciência que associa os conhecimentos da ecologia com os da toxicologia, em que a primeira trata das relações entre os seres vivos e o ambiente, e a segunda estuda os efeitos adversos de determinada substância em um dado organismo, clareando o mecanismo de ação tóxica da mesma.(ZAGATTO, 2008). A ecotoxicologia, como ciência objetiva, estuda os efeitos de diversas substâncias nos diversos ecossistemas e organismos vivos, incluindo a interação daquelas com o meio nos quais os organismos vivem.

3.2 - POLUIÇÃO EMERGENTE DOS RECURSOS HÍDRICOS

3.2.1 - DEFINIÇÃO DE POLUENTE EMERGENTE.

O termo “poluente emergente” se refere a qualquer tipo de contaminante originário de produtos anteriormente não detectados ou que não eram problematizados na área de saúde e no meio ambiente (VALCAREL 2011). Neste grupo de poluentes tem-se os produtos para uso veterinário, produtos de higiene pessoal, e os agrotóxicos. Merece destaque os medicamentos — que atingem o meio ambiente por meio de descartes ou pela excreção em sua forma inalterada pelo organismo animal. A atenção maior a este tipo de poluente emergente se dá tanto pela crescente incidência da concentração destes no meio ambiente, bem como o aumento de estudos que evidenciam o risco à saúde que estes produtos podem causar em casos de exposição em longo prazo (SILVA 2011). Os poluentes emergentes são encontrados no solo, em rios, águas superficiais e até em águas subterrâneas, o que a princípio, não necessitaria de tratamentos específicos para sua potabilidade. (FERREIRA 2008).

3.2.2 - CENÁRIO ATUAL DA POLUIÇÃO EMERGENTE EM AMBIENTES AQUÁTICOS NO BRASIL.

A água é considerada um recurso renovável disponível para o consumo humano. Desempenha papel importante dentro do meio ambiente e é fonte de recursos para as diferentes formas de vida. No entanto, atividades industriais e o descarte inadequado de resíduos vêm excedendo a capacidade de recuperação da potabilidade da água para consumo humano. Atualmente tem-se a questão do estresse hídrico, marcado pela diminuição da qualidade da água, sobretudo devido à poluição por esgotos domésticos e industriais.

No Brasil tem-se a Política de Recursos Hídricos, que objetiva assegurar às gerações atuais e futuras, a adequada disponibilidade de água, conforme os padrões de qualidade para consumo humano (BRASIL 1997). A crescente preocupação relacionada aos recursos hídricos culminou na criação de um decreto que estabeleceu definições e procedimentos para o controle da qualidade da água de sistemas de abastecimento, além de instituir mecanismos e instrumentos para divulgação ao consumidor de informações sobre a qualidade da água recomendada para consumo humano (BRASIL 2005). No Brasil, a portaria 2914/12, do Ministério da Saúde, define os padrões de potabilidade para a água. Neste documento não estão listados compostos como o 17 β -Estradiol e o 17 α -Etinilestradiol, assim como nenhum outro desregulador endócrino ou outro medicamento considerado prejudicial à saúde humana (CORDEIRO e VIEIRA, 2009). Tal condição leva estes compostos a não serem identificados e nem sequer serem tratados nas estações de tratamento de água (D'ACENZO *et al.*; 2003).

Contrastando com a realidade brasileira, órgãos como a União Europeia (EU), a Agência de Proteção Ambiental do Norte da América (EPA) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), já publicaram diretrizes e leis que visam alertar a respeito dos riscos da presença de hormônios em águas e exigindo a remoção destes, a fim de estabelecer limites aceitáveis para as águas disponíveis ao consumo humano (ESPLUGAS *et al.*, 2007).

No Brasil, as condições de desenvolvimento socioeconômico devem estar atreladas a questão da preservação e recuperação da qualidade ambiental e conseqüentemente para a saúde humana, como preconiza a diretriz da Lei 6938/ 81, que em seu artigo 2º discorre sobre a necessidade da defesa dos interesses nacionais relativos à preservação ambiental e a garantia da proteção e dignidade da vida humana dos brasileiros (BRASIL, 1981). Desta forma, toda situação, advinda ou não de processos tecnológicos que comprometa a saúde e o meio ambiente deve ser avaliada, e uma ferramenta importante para tal avaliação se encontra dentro das metodologias e conhecimentos que compõem a área voltada para os biotestes.

3.3 - HORMÔNIOS 17 β -ESTRADIOL E 17 α -ETINILESTRADIOL COMO POLUIDORES EMERGENTES.

3.3.1 - HORMÔNIOS 17 β -ESTRADIOL E 17 α -ETINILESTRADIOL E A AÇÃO DESREGULADORA ENDÓCRINA.

Os hormônios 17 β -Estradiol e 17 α -Etinilestradiol pertencem ao grupo de substâncias denominadas de “desreguladores endócrinos”, que são substâncias exógenas que ocorrem de forma isolada ou em misturas no meio ambiente, e que apresentam propriedades que desequilibram o sistema endócrino no organismo de

seres humanos e animais. Podem danificar diretamente um órgão endócrino; alterar diretamente a função de um órgão endócrino; interagir com um receptor de hormônios ou alterar o metabolismo de um hormônio em um órgão endócrino (BILA, *et al.*, 2007). A maioria dos desreguladores endócrinos é lipofílicos, bioacumulativos e tem baixa pressão de vapor, o que facilita a dispersão e difusão no meio ambiente.

A principal origem de contaminação por hormônios dos recursos hídricos acontece pela excreção de homens e mulheres, porém a maior quantidade de eliminação recai sobre as mulheres, que além de produzirem os hormônios estrogênicos, os excretam mais devido ao consumo de contraceptivos hormonais, pela própria fisiologia da fase fértil e da fase pós-menopausa. A maioria dos estrogênios naturais (17β – estradiol e estrona) não se acumula nos tecidos e tem vida curta, mas os estrogênios sintéticos, como o 17α – etinilestradiol e dietilstilbestrol (DES) são mais estáveis e permanecem mais tempo no corpo do que os estrogênios naturais. Os estrogênios naturais são excretados na forma de conjugados polares inativos, predominantemente como glucoronídeos e sulfatos. Porém, estudos demonstram que esses estrogênios são encontrados nas ETE na forma livre, sugerindo que ocorrem reações de transformação dessas substâncias durante o processo de tratamento na ETE (BILA *et al.*, 2007). A contaminação por estrógenos e seus derivados em águas de rios, águas tratadas e em águas disponíveis para o consumo humano é preocupante do ponto de vista de risco à exposição crônica. A preocupação aumenta devido à ausência de processos que removam estes contaminantes das estações de tratamento de águas. (WESTERHOFF *et al.*, 2005).

3.3.2 - IMPACTOS DOS HORMÔNIOS 17B-ESTRADIOL E 17A-ETINILESTRADIOL NA SAÚDE HUMANA E NO MEIO AMBIENTE.

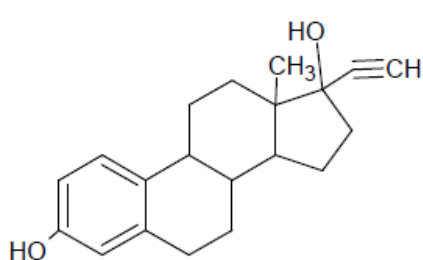
Segundo FERREIRA (2008), o desenvolvimento de algumas doenças como câncer de mama, de útero e de próstata, além do desenvolvimento sexual anormal, bem como a redução da fertilidade masculina, e o aumento de doenças como síndrome dos ovários policísticos e efeitos neurocomportamentais podem ser induzidos por desreguladores endócrinos. Trabalhos publicados na literatura relatam que a exposição a estrogênios é o principal fator de risco para o desenvolvimento de endometriose. (COLEMAN *et al.*, 2005; SOLOMON E SCHETTLER, 2000; U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1997; DASTON *et al.*, 1997). Os primeiros efeitos relacionados à contaminação por desreguladores endócrinos foram observados em 1940, quando aviadores que controlavam ou aplicavam inseticidas apresentaram redução no número de espermatozoides. (SINGER, 1949; *apud* WARING e HARRIS, 2005). Em humanos, os hormônios esteroides (androgênios e estrogênios) regulam o processo de desenvolvimento fetal, como a diferenciação sexual. Androgênios, incluindo a testosterona, regulam o desenvolvimento do fenótipo masculino e um distúrbio no nível de esteroide pode causar feminização de fetos masculinos, caso exista um excesso de compostos estrogênicos ou uma deficiência de androgênios. Por outro lado, fetos femininos podem se tornar masculinizados devido ao excesso de androgênio ou pela falta de estrogênio durante o período de diferenciação sexual do feto. (WARING e HARRIS, 2005).

3.3.3 - CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DOS HORMÔNIOS 17 β -ESTRADIOL E 17 α -ETINILESTRADIOL.

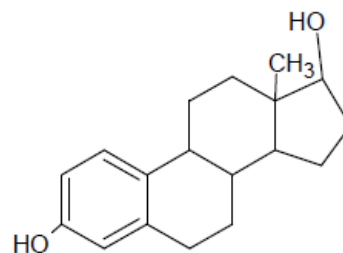
3.3.3.1- CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS.

O estrogênio natural 17 β -estradiol é formado por 18 carbonos com um anel fenólico (FIGURA 1), que é o componente responsável pela alta afinidade com que se liga ao receptor de estrogênio e evidencia a resposta estrogênica, e existe também uma hidroxila ligada ao anel de cinco membros. Quando, porém, ocorre a alteração do anel fenólico, a afinidade pelo receptor estrogênico é suprimida. (FERREIRA, 2008).

FIGURA 1: Estrutura química do 17 α -etinilestradiol e 17 β -estradiol



17 α -etinilestradiol



17 β -estradiol

O estrogênio 17 α -etinilestradiol é sintético, sendo encontrado nas pílulas anticoncepcionais e usado nas terapias de reposição hormonal. Em águas, o estrogênio sintético é mais estável e possui alto potencial de atividade. Devido à presença do grupo etinil na fórmula estrutural, apresenta resistência à biodegradação, sendo, portanto, mais encontrado nas estações de tratamento de efluentes. A presença de um grupo etileno e de uma hidroxila ligada ao anel de cinco membros diferencia-se do estrogênio 17 β -estradiol. Já a presença de um anel fenólico é responsável pelo encaixe no receptor ligando a atividade estrogênica. (GENNARO, 2004).

3.3.3.2 - 17 β -ESTRADIOL E 17 α -ETINILESTRADIOL E SUAS AÇÕES COMO ANTIOXIDANTES EM ORGANISMOS VIVOS.

Agente antioxidante é qualquer substância que, presente em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, tem a capacidade de atrasar ou inibir a oxidação deste substrato de maneira eficaz. Para atividades biológicas, atividade antioxidante é definida como a capacidade de um composto inibir a degradação oxidativa (ROGINSKY, 2005).

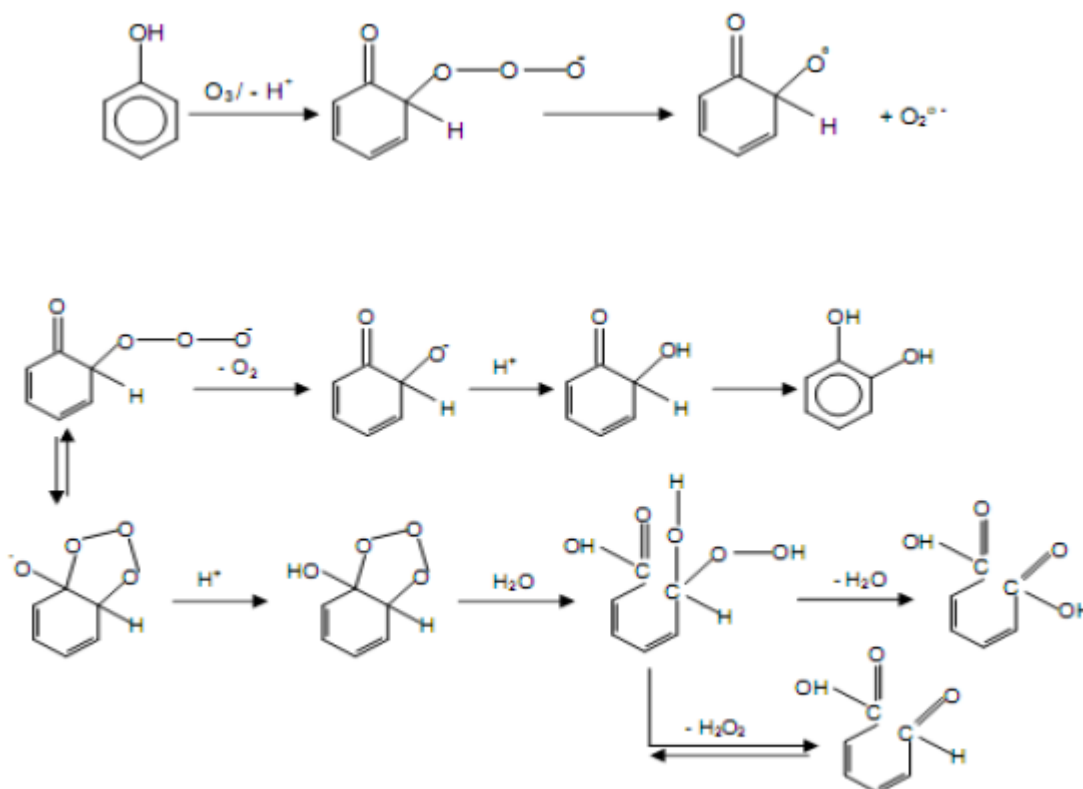
Estrógenos são antioxidantes potentes tanto “in vitro” como “in vivo”. Pesquisa realizada por STACEY (1996) procurou comparar a atividade antioxidante de 17 β estradiol com outros antioxidantes solúveis em lípides (α -tocoferol e β -caroteno). Evidenciou-se neste estudo que o estradiol foi tão eficaz como agente antioxidante quanto ao α -tocoferol, em termos de peroxidação de ácidos graxos.

Estudos conduzidos por KACHADOURIAN *et al* (2005) sugerem que “in vivo” ocorra uma superprodução de superóxido que interfere na cadeia respiratória. Tal mecanismo foi quimicamente elucidado por LIEHR (2008), no qual segundo este autor, os estrogênios estão envolvidos em um ciclo redox que envolve o anel catecol presente na molécula de estrógeno, que é então convertido em quinona por transferência de elétrons.

Com relação às atividades antioxidantes e as funções fisiológicas das algas *Euglena Gracilis*, estas produzem grandes quantidades de α -tocoferol, que visam impedir a decomposição oxidativa de clorofila, das membranas lipídicas e das proteínas sensíveis a espécies reativas de oxigênio (EROs). (MUNNE-BOSCH E ALEGRE, 2002).

3.4 - PROCESSOS QUÍMICOS PARA REMOÇÃO DE 17 β -ESTRADIOL E 17 α -ETINILESTRADIOL EM AMBIENTES AQUÁTICOS.

Na atualidade, vários processos estudados objetivam a remoção de 17 β -Estradiol e 17 α -Etinilestradiol, tanto em águas quanto em efluentes. Os estudos vêm sendo realizados em condições variadas, cujo primeiro passo é avaliar o processo como ocorre, bem como a prospecção de tais processos para condições ditas naturais. Estudos de remoção iniciam-se em solventes diversos, sendo depois completados para pesquisas realizadas em água, nos quais se criam situações semelhantes às encontradas no ambiente. Um dos processos destinados à remoção de 17 β -Estradiol e 17 α -Etinilestradiol é conhecido como Processos Oxidativos Avançados (POA). Estes processos são definidos como a promoção de uma condição química que gere radical hidroxila em quantidade suficiente para afetar uma molécula contaminante, de modo a remover sua atividade biológica conhecida e promover assim o tratamento de purificação de água. Pelo ataque do radical hidroxila se iniciam complexas reações em cascata que podem levar a mineralização de compostos orgânicos, conforme mostra a FIGURA 2 (DALMÁZIO, 2007).

FIGURA 2: Processo de degradação de compostos fenólicos (BILA *et al* 2007).

Os agentes oxidantes mais comumente utilizados são o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ozônio (O_3), cloro (Cl_2) e dióxido de cloro (ClO_2). Os processos oxidativos avançados utilizam H_2O_2/UV , TiO_2/UV , O_3/UV e H_2O_2/Fe^{+2} . (MELO *et al.*, 2009). Diferenciam-se basicamente quanto ao custo, aplicabilidade em estações de tratamento de água e esgoto, eficácia e eficiência na remoção do poluente em estudo. As análises de eficiência e eficácia dos processos limitam-se aos aspectos químicos da remoção, sendo as discussões sobre a ecotoxicidade e o uso de biotestes de bancada pouco explorados.

3.5 - BIOTESTES E SEU EMPREGO NA SAÚDE E MEIO AMBIENTE.

Com o aumento populacional demográfico, da capacidade tecnológica e do interesse do homem pelas questões ambientais, a preocupação com o monitoramento ambiental aumentou de forma significativa através de pesquisas direcionadas para avaliação de contaminação de efluentes por metais pesados e substâncias orgânicas dos mais variados tipos. Dentre as substâncias orgânicas, podem-se destacar os hormônios 17β -Estradiol e 17α -Etinilestradiol. Atualmente, diversos segmentos como entidades ambientais, institutos de pesquisa, indústrias, laboratórios e universidades brasileiras vêm desenvolvendo e intensificando pesquisas de desenvolvimento de biotestes ambientais para diversas finalidades, sendo a manutenção da saúde e preservação do meio ambiente uma das principais linhas trabalhadas (BILA *et al.*, 2007).

No que se refere ao desenvolvimento de biotestes, tem-se os fenômenos de alteração fisiológica e de intoxicação, sendo este último definido como um conjunto de sintomas que demonstra o desequilíbrio orgânico promovido pela ação de uma substância tóxica. Alterações fisiológicas, por sua vez, denotam uma mudança no estado fisiológico normal, frente à presença de uma substância, mas sem o caráter deletério comum na intoxicação. Ainda com relação à intoxicação, esta pode ser de caráter agudo ou crônico, e representar um estado patológico do organismo diante da presença de dada concentração de agente tóxico. Denota que a defesa ou a barreira homeostática do organismo será rompida, com evidência de nocividade e prejuízo para a sua fisioeconomia normal. O organismo suscetível a estas ações é o do ser humano ou de qualquer outro animal, ou vegetal (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

Para credenciar um micro-organismo para seu uso em biotestes, a sua fisiologia deve ser amplamente conhecida, principalmente no que se refere às alterações que podem advir frente à exposição de certo contaminante. Os biotestes podem ser úteis para identificação de um contaminante, ou para avaliação ecotoxicológica dos mesmos. Os métodos de análises da ecotoxicologia são feitos com organismos representativos do ambiente e que servem para avaliar a toxicidade de agentes químicos no meio hídrico, utilizados para vários fins, destacando a avaliação da toxicidade relativa de diferentes substâncias e a sensibilidade relativa dos organismos aquáticos (BUIKEMA e VOSHELL, 1993).

Atualmente, contam-se vários ensaios de toxicidade que utilizam micro-organismos em seus biotestes, sendo alguns padronizados nacional e internacionalmente por associações ou organizações de normalização como: Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), Association Française de Normalisation (AFNOR), American Society for Testing and Materials (ASTM), Deutsches Institute für Normung (DIN), International Organization for Standardization (ISO) e Organization for Economic Co-operation and Development (OECD).

3.5.1 - USO DE ALGAS DO GÊNERO *Euglenas Gracilis* EM BIOTESTES ENVOLVENDO POLUENTES EMERGENTES.

3.5.1.1 - FISILOGIA DAS EUGLENAS GRACILIS.

Euglena é um gênero de alga unicelular da divisão Euglenozoa, classe Euglenophyceae. Enumeram-se cerca de 1000 espécies, e dentre elas, destaca-se a *Euglena Gracilis* encontrada em ambientes dulcícolas, marinhos ou de águas salobras. Não possui parede celular, reproduz-se assexuadamente e é um protista

mixotrofo, 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 estão presentes principalmente em águas doces. São seres que armazenam óleos e polissacarídeos como reserva, apresentando muitos plastos contendo clorofila a e b e carotenos. As euglenas 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,. (REVIERS, 2006).

3.5.1.2 - ATIVIDADES FOTOSSINTÉTICAS DAS *Euglenas gracilis*.

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).

As alterações nos complexos proteína-pigmento, bem como a diminuição da atividade de fotossíntese, e a inibição da transferência de elétrons são sintomas comuns quando se tem uma situação adversa ao desenvolvimento das algas que promova um estresse (MILES, 1990). O Fotossistema II (FS II) e o complexo de água-oxidante são os locais sensíveis às condições de estresse e de alterações na atividade (PLEKHANOV e CHEMERIS, 2008).

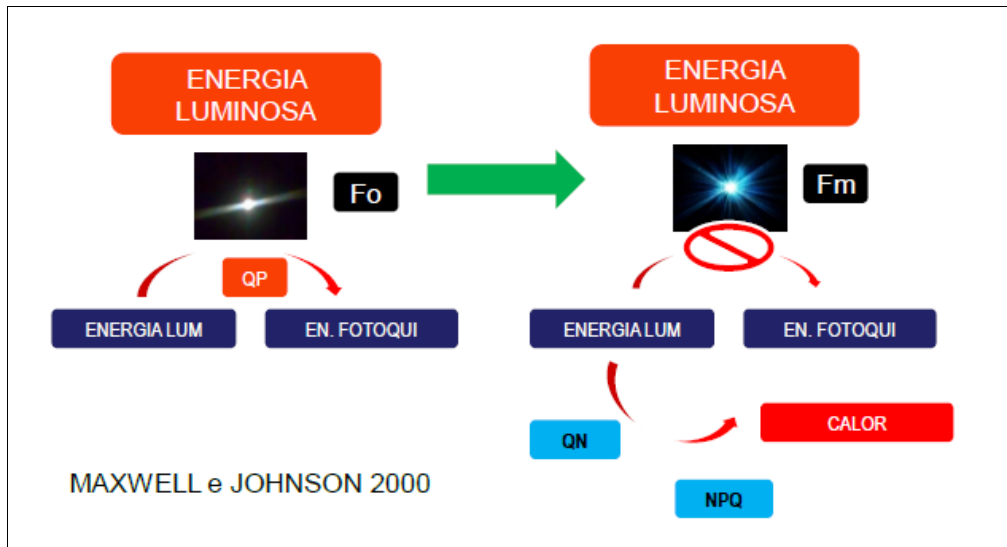
Outros parâmetros úteis ao biomonitoramento fotossintético são os relacionados ao rendimento quântico. Quando um organismo é exposto a uma energia luminosa, a fluorescência varia de um valor inicial (F_0), indo até um valor máximo suportado (F_m). Este processo gera dissipação de energia, conhecida como Fotoquímica, produz a energia necessária ao metabolismo. O processo seguinte corresponde ao decréscimo de F_m até atingir novamente F_0 , o que deixa a clorofila apta a receber novamente a energia luminosa e reiniciar novamente o processo de obtenção de energia pela luz.

O rendimento da atividade fotossintética, também conhecido como "Yield" (Y) é medido pela diferença entre os valores de F_m e F_0 , expresso na equação: $Y = F_m - F_0 / F_m$.

O aumento da luminescência de F_0 até F_m gera então uma dissipação conhecida também como energia de excitação.. Esta dissipação da fluorescência é chamada de extinção fotoquímica (qP), e é responsável pela obtenção de energia para a sobrevivência do ser fotossintético. Paralelo a este fenômeno, pode ocorrer a dissipação de energia na forma de calor que tem por objetivo promover uma melhora no rendimento por aumentar o valor de F_m a ser alcançado, distanciando este de F_0 , o que segundo a equação anteriormente citada, aumenta o valor de Yield.. Este processo é chamado de extinção não fotoquímica, e se divide em qN e

NPQ. A diferença entre os dois envolve a questão do segundo contar com a formação de carotenoides – principalmente zeaxantina – como auxiliar neste processo.. (FIGURA 3; MAXWELL E JOHNSON, 2000).

Figura 3: Mecanismo de dissipação de energia na forma de calor.



O rendimento e as dissipações são alterados em resposta a qualquer estresse ambiental, como irradiâncias baixas ou elevadas, alta temperatura, poluentes orgânicos e inorgânicos. (BOLHÀR-NORDENKAMPF e OQUIST, 1993; KRAUSE, 1988; KRAUSE e WEIS, 1991).

Como resultado, tornaram-se parâmetros comuns para o estudo da interação do ambiente com a atividade fotossintética das plantas, microalgas (NIELSEN e NIELSEN, 2008). Assim, este estudo adotou este método para monitorar o estresse de poluentes 17β -Estradiol e 17α -Etinilestradiol sobre a alga bioteste *E. Gracilis*, com um objetivo final de adicionar parâmetros de fluorescência como parâmetros ecológicos.

3.6 - AÇÕES DOS HORMÔNIOS 17β -ESTRADIOL E 17α -ETINILESTRADIOL SOBRE FISIOLOGIA DE *Euglenas Gracilis*.

Em termos hormonais, o estrógeno não apresenta interação direta com a atividade fisiológica das euglenas, porém, devido ao fato de ser fonte de carbono e apresentar elevada lipofilia, este hormônio pode se acumular no interior destas algas e influenciar no comportamento destas, seja por biomagnificação, seja por ocupar lugar destinado a substâncias importantes no seu metabolismo, como o tocoferol, que apresenta características semelhantes aos hormônios sintéticos. Estudos conduzidos por Ekelund (2008) utilizando *E. Gracilis* na presença de estrógenos e testadas no sistema NG TOX apontaram que estas algas foram sensíveis à exposição de compostos estrogênicos. Este trabalho evidenciou que a motilidade foi o parâmetro mais afetado nestas algas, podendo ser usado como um sensor de estrogenicidade em ambientes aquáticos.

3.7 - BIOTESTES: CONHECER AS ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA DAS ALGAS ADVINDAS DA PRESENÇA DE 17β -ESTRADIOL E 17α -ETINILESTRADIOL E O SEU POSSÍVEL USO EM BIOTESTES.

O emprego de biotestes se baseia na obtenção de respostas fisiológicas alteradas de seres vivos quando estes são expostos à presença de um contaminante ambiental. Nesta exposição se obtém um nítido desvio do status do que é considerado fisiologicamente normal para aquele organismo. (ARIAS, 2007). Os biotestes permitem a emissão de sinais que apontem — seja na análise de água no meio ambiente, seja na análise de algum resíduo de experimento químico de bancada, se há ou não a presença de alguma substância que desvia o padrão fisiológico de um dado organismo (ARIAS, 2007), ou também, pode ser útil para

avaliar a eficiência de um processo de remoção química de certo contaminante, pois a persistência dos parâmetros alterados ou a não redução significativa podem indicar falha no processo. Ganha importância ainda se o resultado for um desvio do comportamento esperado das algas, e passível de ser considerado tóxico também no ambiente e não apenas em condições controladas. Considerando toda a questão previamente abordada, este trabalho visa iniciar uma série de estudos que permitam o credenciamento da *E. Gracilis* como bioindicadoras de presença de hormônios em águas, principalmente nos testes rápidos de bancada destinados a remoção química destes contaminantes. A vantagem esperada na utilização *E. Gracilis* em biotestes é que ela permite uma avaliação que também envolve a qualidade ambiental. A avaliação da interferência na atividade fotossintética das *E. Gracilis* pode abrir a possibilidade de ter-se no futuro um novo bioindicador seguro, rápido e não agressivo a vida animal (sacrifício de animais, como peixes nos testes de VTG) e não restrito quanto ao uso de leveduras geneticamente modificadas.

4. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

4.1- PROCEDIMENTOS E MÉTODOS.

Este estudo foi realizado no Laboratório de Fotoquímica e Fotobiologia da Universidade da Região de Joinville.

4.2 - DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental, envolvendo o uso de algas do gênero *E. Gracilis* KLEBS, obtidas da coleção da Universidade de Gottingan, Alemanha. Estas algas foram avaliadas quanto às alterações comportamentais e quanto a atividade fotossintética, quando submetidas ao contato com os hormônios estrogênicos, em

meio que continha ainda acetona utilizada como co-solvente destes hormônios e que se comportava também como fonte de carbono para estas algas. Tal análise se deu em diferentes tempos de exposição

4.3 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1- Micro-organismos e Manutenção.

Os testes foram realizados com cepas de *Euglenas Gracilis* em meio mineral e orgânico preparado conforme descrição feita por Checcuci *et al* (1976). A manutenção da cultura ocorreu sob exposição da luz 20 W m², foto período de 12 horas, e temperatura de 20° C. Todos os testes foram feitos a partir de uma única cultura, que foi fracionada com o intuito de manter as características e evitar desvios relativos a preparos diferentes de meio mineral.

4.3.2 - SOLUÇÕES DE 17 β -ESTRADIOL E 17 α -ETINILESTRADIOL

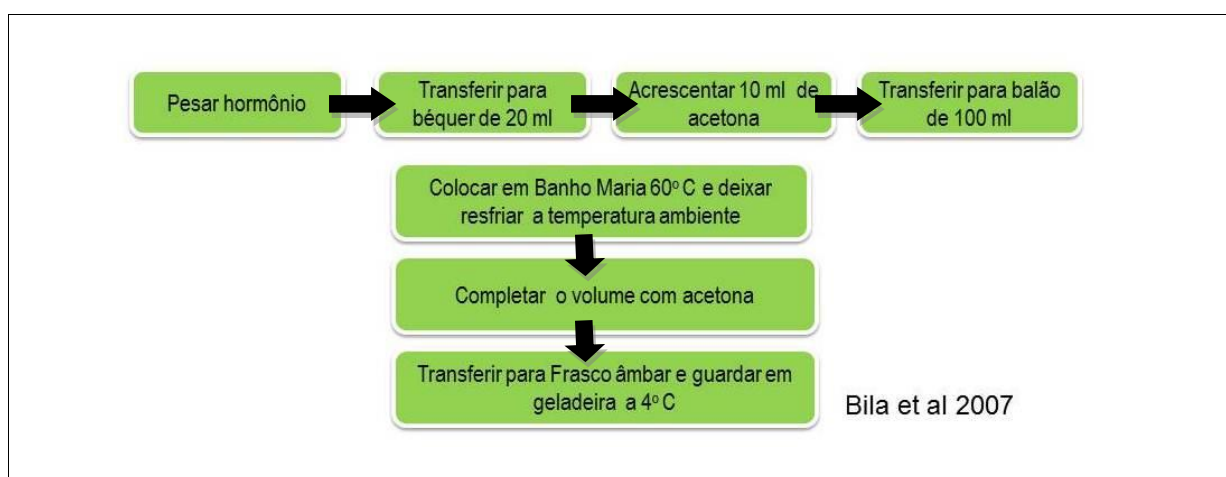
A solução testada foi obtida a partir do padrão de 17 α etinilestradiol e 17 β etinilestradiol, do laboratório Sigma – AECrich®. Devido à baixa solubilidade de 17 β -estradiol e de 17 α -etinilestradiol em água, e a necessidade de se ter uma fonte de carbono que servisse de parâmetro para os testes, as soluções estoque foram preparadas com concentração de 0,1 mg/ml de ambos hormônios em acetona e estocadas a 4°C.

4.3.3 - PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS A SEREM TESTADAS

As soluções nas concentrações iniciais desejadas para cada experimento foram então preparadas a partir da solução estoque e de água Mili-Q ultrapura (livre

de matéria orgânica, sais e micro-organismos) obtida pelo sistema da Milipore. As concentrações utilizadas para o teste, obtidas a partir da solução estoque, não seguiram os dados existentes na literatura referentes à contaminação no Brasil e no mundo, pois a intenção não foi avaliar o impacto da atividade “*in loco*”, mas sim conhecer a existência ou não de influência significativa dos hormônios em testes controlados. A concentração escolhida foi de 0,005mg/ml de cada hormônio por atender às técnicas exigidas para os testes realizados. O preparo destas soluções foi realizado em uma farmácia de manipulação que atendia aos requisitos de biossegurança na manipulação destes compostos. O solvente escolhido foi a acetona P.A.; com densidade 0,785 g/ml (Laboratório Cinética ®), devido a sua boa solubilidade dos hormônios neste reagente e por ser este uma conhecida fonte de carbono para as algas. Foram preparadas soluções estoque de 0,1 mg/ml (FIGURA 4).

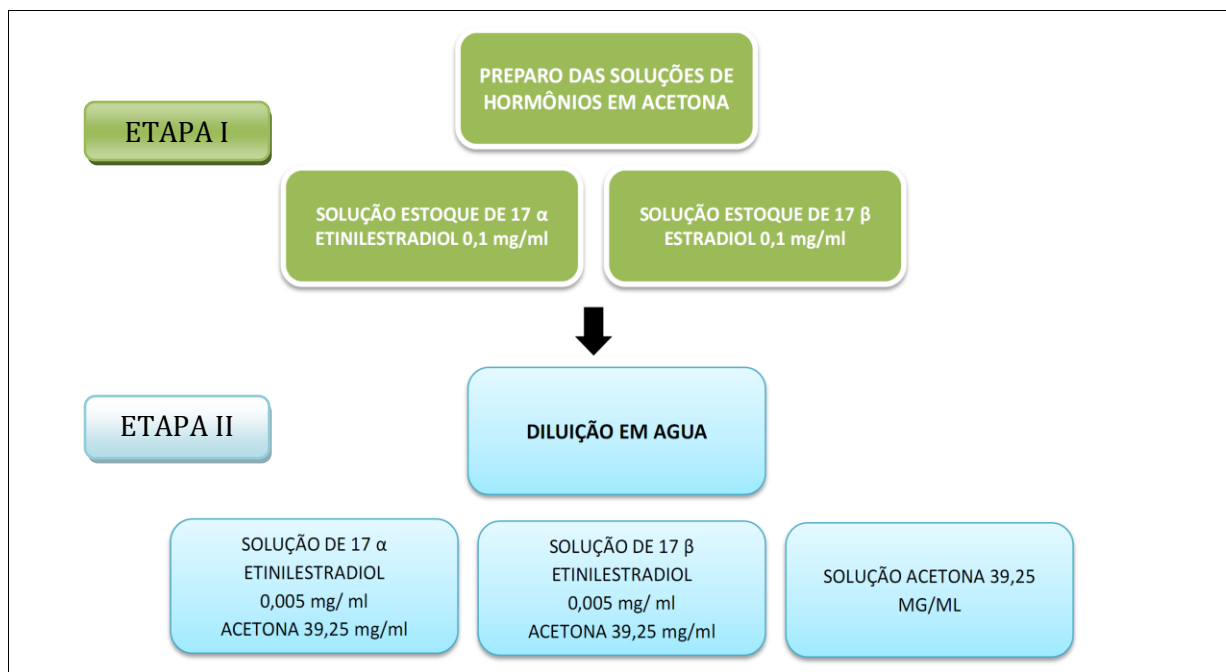
FIGURA 4: Etapas de preparo da solução de hormônios em acetona. Bila *et al* 2007



A diluição seguiu o seguinte procedimento: pegou-se 10 ml da solução estoque e dilui-se a mesma em 190 ml de água, obtendo-se uma concentração final de hormônio de 0,005 mg/ml. A concentração final de acetona passou a ser 39,25

mg/ml (FIGURA 5). Esta solução é a que foi empregada nos testes na presença de *E. Gracilis*.

FIGURA 5: Etapas de preparação da solução aquosa dos hormônios

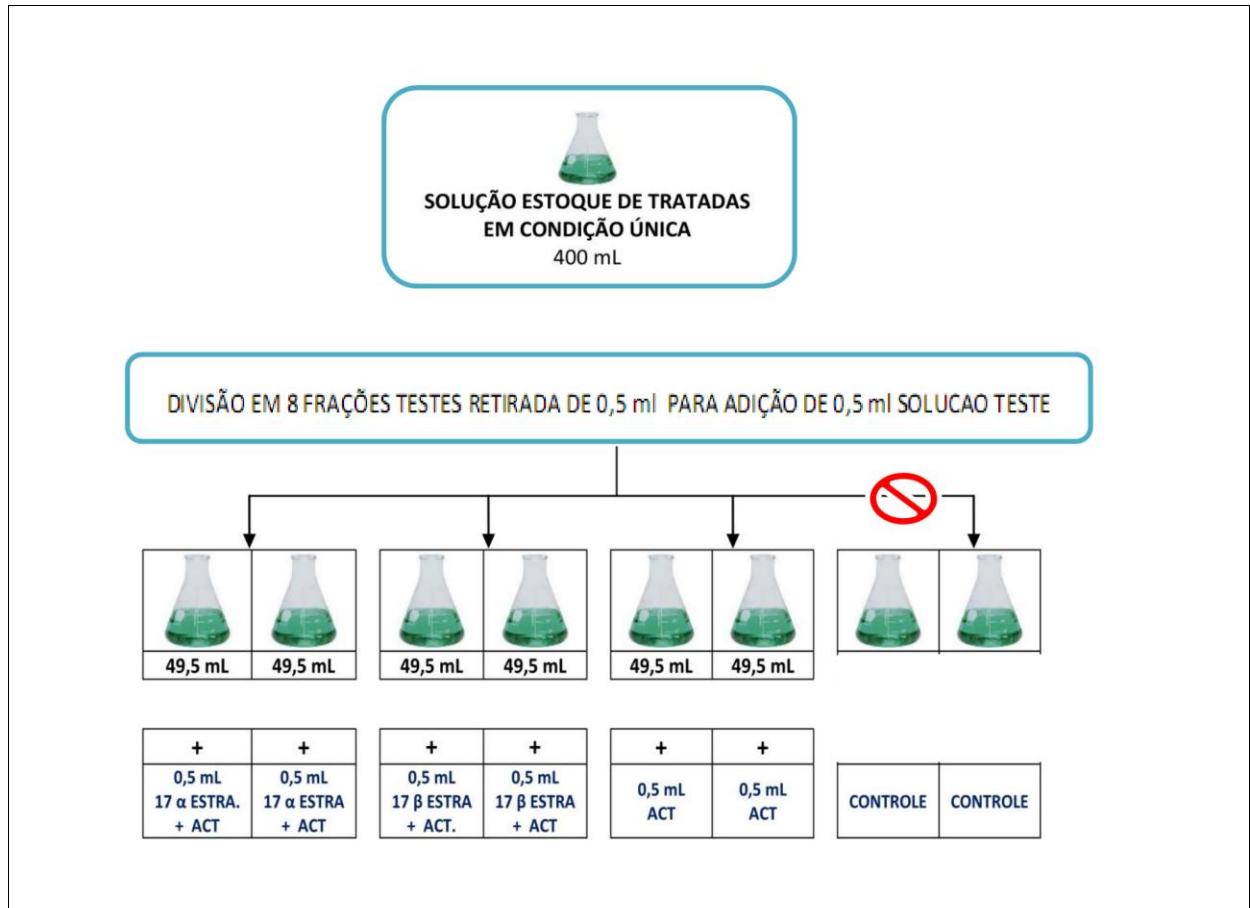


4.3.4 - PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

As culturas preparadas nas condições descritas em 4.3.1 foram mantidas em uma única cultura de 400 ml, tratadas durante um período de uma semana a fim de se manter homogeneidade do meio para a aplicação dos testes futuros. Esta cultura foi subdividida em 8 frações de 50 ml, as quais receberam posteriormente a adição da solução dos hormônios testes. A adição dos hormônios atendeu ao seguinte procedimento: inicialmente foi retirado 0,5 ml de cada cultura, para a adição em seguida de 0,5 ml da solução contendo hormônio, perfazendo um volume final de 50 ml para cada cultura, com concentração de hormônios de 0,0001 mg/ml e de 0,785 mg/ml de acetona. Obteve-se ao final: duas amostras para controle, duas para o meio contendo apenas acetona 0,785 mg/ml, duas para o meio contendo 17α

etinilestradiol 0,0001 mg/ml e acetona 0,785 mg/ml, duas para o meio contendo 17 β estradiol 0,0001 mg/ml e acetona 0,785 mg/ml (FIGURA 6). Os ensaios seguintes foram realizados em duplicatas.

FIGURA 6: Esquema de preparo das culturas de *E. gracilis* para o teste. Todas as culturas testadas foram originadas de uma única cultura mãe.



4.3.4.1- CRONOGRAMA DOS TESTES AGUDOS QUE FORAM REALIZADOS

Os testes agudos foram realizados segundo cronograma proposto por Ekelund (2008), no qual se teve uma avaliação imediata dos resultados, a fim de se verificar alguma reação imediata, 1 hora depois, com intuito de verificar uma reação inicial mais tardia; 24 horas após e 7 dias, para verificar possíveis efeitos e adaptações frente a presença de contaminantes (FIGURA 7).

Figura 7: Cronograma de análises

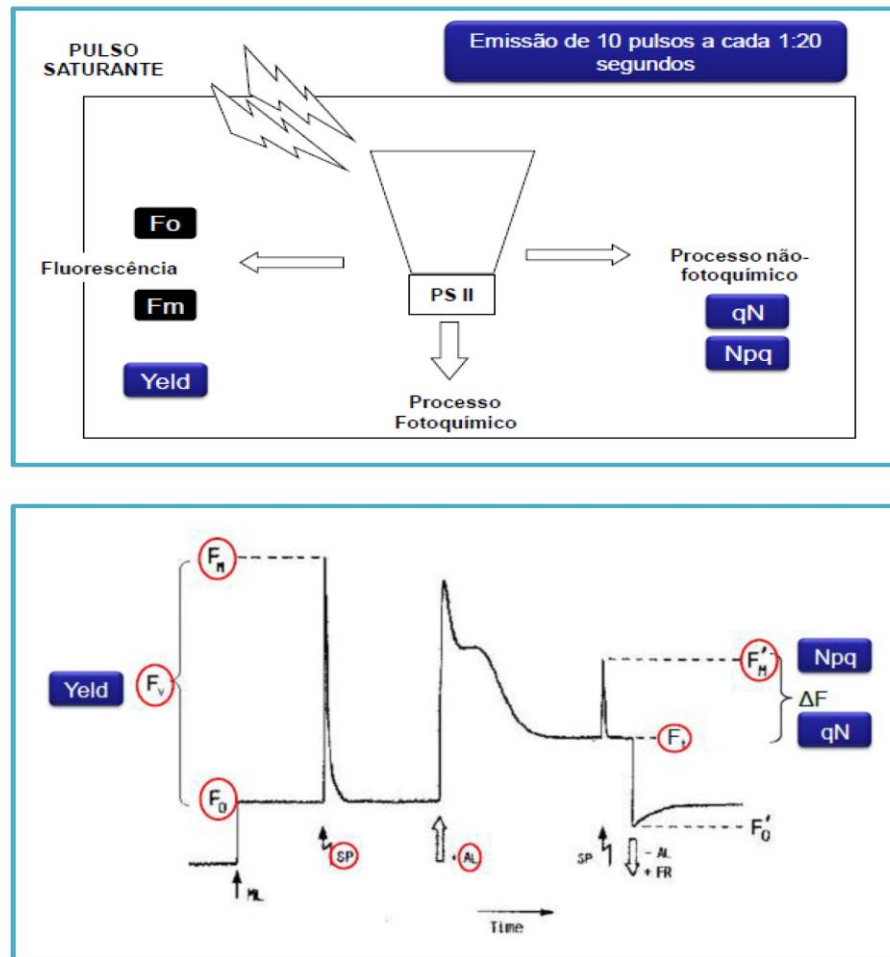
CRONOGRAMA DAS ANÁLISES				
AMOSTRAS	PERIODOS EM QUE FORAM REALZIADOS OS TESTES			
CT	Imediatamente a adição dos hormônios	1 hora após a adição dos hormônios	24 horas após a adição dos hormônios	7 dias após a adição dos hormônios
ACT 0,785mg/ml				
HM 17 α 0,0001 mg/ml + ACT 0,785mg/ml				
HM 17 β + 0,0001 mg/ml + ACT 0,785mg/ml				

4.3.5 - TESTE DE EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA NO PAM

4.3.5.1- MEDIÇÃO DE PARÂMETROS DE EFICIÊNCIA FOTOSSÍNTESE USANDO O EQUIPAMENTO PAM.

Parâmetros de fotossíntese foram medidos através de um fluorímetro de amplitude de pulso modulada PAM 2000, 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 bem como de têmpera (fotoquímico e não fotoquímico) foram então calculados. As culturas testadas foram adaptadas no escuro por 1 hora, sendo que em seguida foram retirados cerca de 5ml e transferidos para cubeta do equipamento PAM. Foi então submetida à emissão dos pulsos de luz saturante para avaliação da atividade fotossintética (FIGURA 8).

FIGURA 8: 10 Pulsos de luz saturante foram emitidos em intervalos de 1:20 segundos. A variação da fluorescência emitida ($F_m - F_o$) sobre a fluorescência máxima determinava a eficiência fotossintética a cada pulso emitido. Variações de F_o e F_m nos pulsos subsequentes determinavam a dissipação qN e Npq .



A emissão de um pulso de luz saturante permitiram 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⁻²/s. Após 20 s de cada etapa de iluminação, um pulso saturante foi aplicado e o rendimento fotossintético e a ETR (taxa de transporte de elétrons) foram medidos automaticamente. (FIGURA 9).

FIGURA 9: Imagem do equipamento PAM. Fonte: Arquivo pessoal do pesquisador.



Em seguida, os dados foram plotados contra o PAR incidente (radiação fotossinteticamente ativa em molm-2/s).

Desta forma, analisou-se a interferência que os hormônios promoveram na:

- Eficiência (YIELD);
- Extinção não fotoquímica (QN);
- Extinção Não-Fotoquímica da Fluorescência sem necessidade de fluorescência mínima (NPQ).

Todos os testes foram realizados sempre no mesmo horário, respeitando-se o tempo de exposição à luz das algas na incubadora, onde se encontravam armazenadas.

4.4 - AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS DAS ALGAS PELO BIOMONITORAMENTO VIA NG TOX.

Os experimentos comportamentais com *Euglena 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. (ERZINGER, CIAMPO e HÄDER, 2011). A ferramenta monitorou, através de análise de imagem em tempo real, o comportamento das algas, usando diferentes parâmetros de movimento do flagelado unicelular fotossintetizante.

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 são homogeneizados e enviados para uma cubeta de observação, conectada a um microscópio, que captura as imagens das células em movimento (**FIGURA 10**). As imagens são gravadas por uma câmara CCD (*charged coupled device*) e digitalizadas por uma placa conectada a um microcomputador, onde são apresentadas em um monitor (**FIGURA 11**). O software então calcula os parâmetros de movimento, velocidade de locomoção, velocidade de subida a superfície, tamanho médio das células; entre outros parâmetros (Häder, 1985). Em seguida é feita a adição das amostras e após um período de 10 minutos é refeita a análise dos parâmetros pelo software. Qualquer alteração nos movimentos, velocidades médias, velocidades de subida a superfície e tamanho celular são calculadas e comparadas com o resultado anterior.

FIGURA 10: Esquema de funcionamento do NG TOX

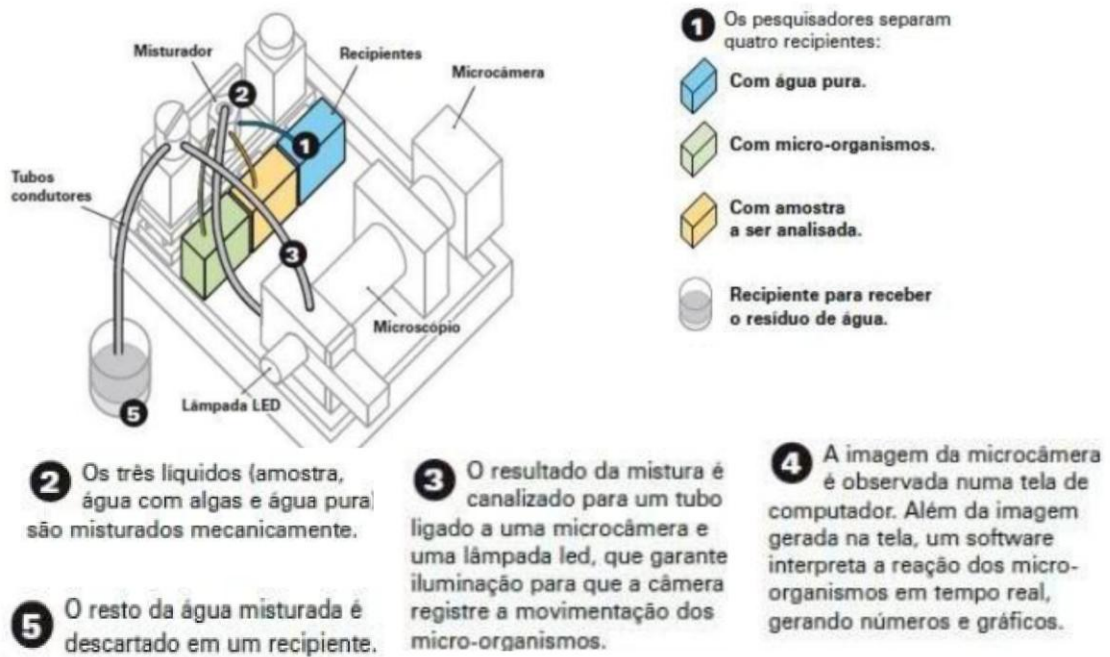
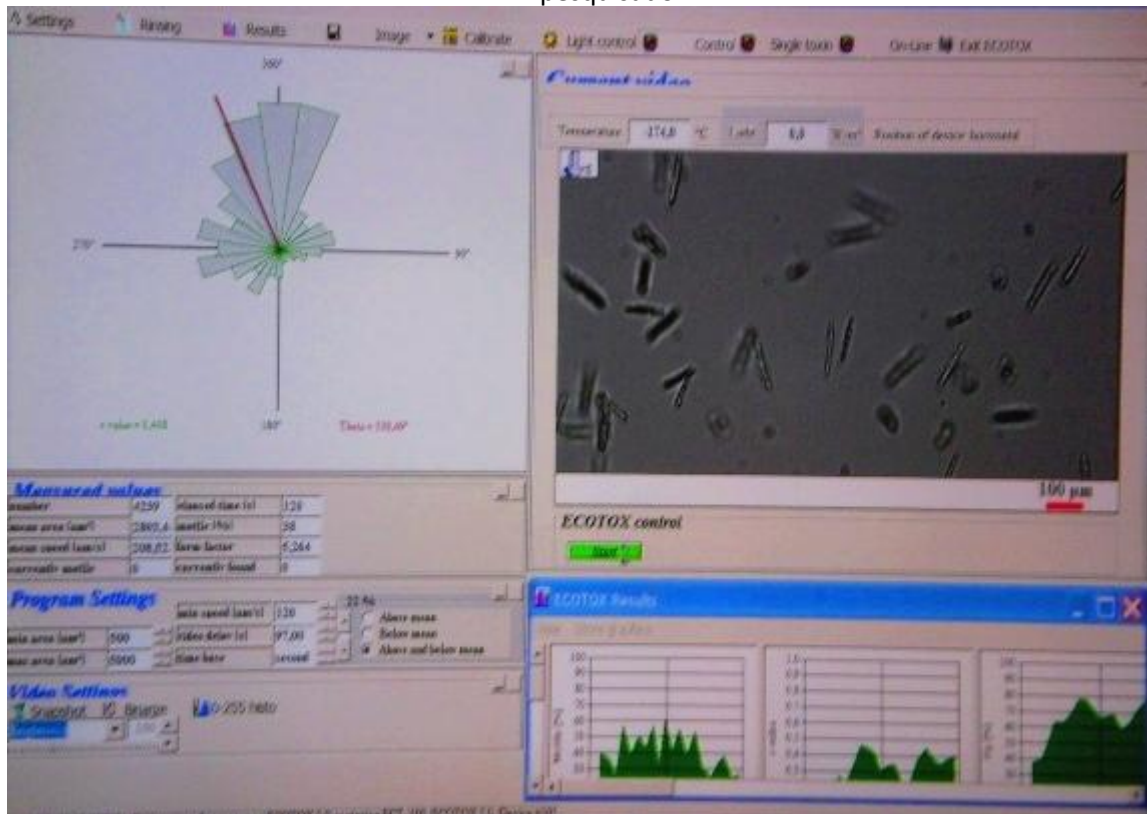


Figura 11: Imagem do software que analisa as algas em tempo real. Fonte: arquivo pessoal do pesquisador



4.4.1- EXTRAÇÃO DA CLOROFILA

Alíquotas de 5ml dos meios de cultura submetidos a presença de hormônios e acetona — mais o controle, foram retiradas nos períodos de 24 horas após e 7 dias após o início dos testes para a extração da clorofila e demais pigmentos para análises. 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® 47mm (figura 12). Os papéis contendo o filtrado (células precipitadas) foram então transferidos para um tubo falcon, e receberam um volume de 5ml de etanol, sendo posteriormente mantidos a 4^oc por 60 minutos para a extração dos pigmentos. As misturas foram então 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 665-705 nm para leitura da clorofila e 400 – 445 nm para leitura de caratenoides; usando para tal análise o espectrofotômetro (UV-160a, SHIMADZU).

FIGURA 12: Processo de filtração para extração da clorofila. Foto: arquivo pessoal do pesquisador.



4.4.2- ANÁLISE DOS DADOS OBTIDOS

Os dados foram avaliados através de ANOVA, técnica univariada que trata dados quantitativos em relação a uma variável independente categórica de três níveis.

Para a análise entre os grupos (testes e controle), 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. Esta parte consta, portanto, das comparações de resultados e médias com base nos itens quantitativos de sua amostragem.

A segunda parte consiste da descrição das demais variáveis, porque formalmente não há nesta parte um teste estatístico de hipótese, embora ela sirva sim para confirmar ou não expectativas a priori sobre os resultados.

Em algumas condições são relatados como *missing values*, ou seja, valores ausentes que não foram detectados, como observado em condições envolvendo as variáveis QN e NPQ nas condições testes imediatos e 7 dias

As análises estatísticas do comportamento das algas avaliadas no NG-TOX foi 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** ® realiza análise estatística 5-PL integrada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES:

5.1 - AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA NA PRESENÇA DOS HORMÔNIOS

5.1.1- AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA LOGO APÓS A ADIÇÃO

No que se refere à eficiência fotossintética (YIELD), os valores de eficiência encontrados nos quatro grupos (17 α etinil estradiol, 17 β estradiol, acetona pura e controle) foram equivalentes durante os dez pulsos de luz saturante promovidos nos

testes realizados com o equipamento PAM. Ocorreu ao longo da emissão dos dez pulsos de luz um decréscimo uniforme e sem variação significativa entre os quatro grupos, conforme se observa no **Gráfico 1**. Isto significa que a luminosidade absorvida inicial apresentava um valor distante da final (fluorescência máxima), sendo que toda a energia obtida no processo de luminescência era convertida na forma de energia fotoquímica mantendo as atividades em perfeitas condições. À medida que a luzes eram emitidas, a fluorescência máxima ia decaindo, o que levava a um decréscimo da eficiência fotossintética. Tal condição mostra uma característica comum entre os meios submetidos à exposição de luz saturante, com decréscimo de eficiência sem mecanismos de fotoproteção definidos.

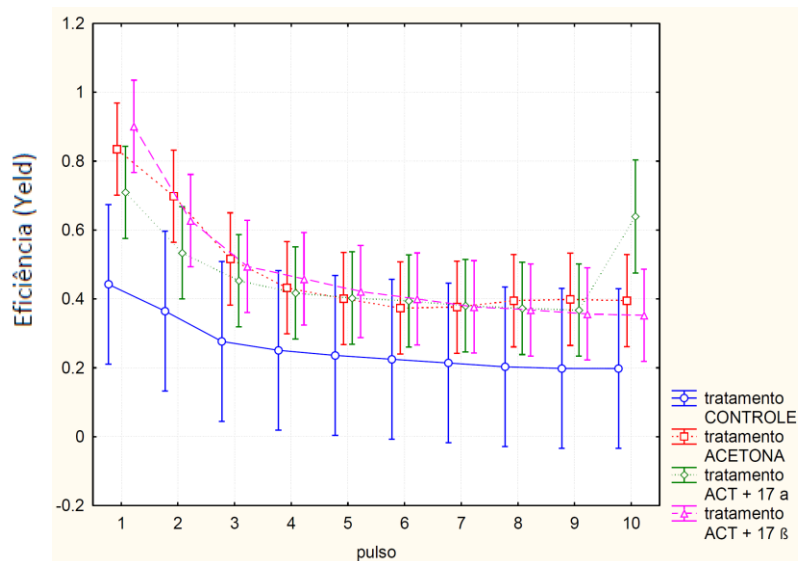


Gráfico 1 Comparação das eficiências fotossintéticas médias para 10 pulsos de luz nas duplicatas ($F(18, 60) = 0,056$; $p = 0,986$). As barras denotam intervalo de confiança de 95% em torno da média. Não há diferenças entre as médias nem entre os pulsos de um mesmo tratamento, nem entre pulsos de tratamento distintos.

5.1.2 - AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA APÓS 1 HORA DA ADIÇÃO DOS HORMÔNIOS

Após a realização das primeiras leituras, as culturas de algas testadas foram guardadas por 1 hora na incubadora ao abrigo da luz, envoltas em papel laminado visando à proteção destas algas sob a exposição da luz. As análises foram realizadas e os resultados obtidos demonstraram uma semelhança de valores de eficiência em todas as condições testadas, como se observa no **Gráfico 2**.

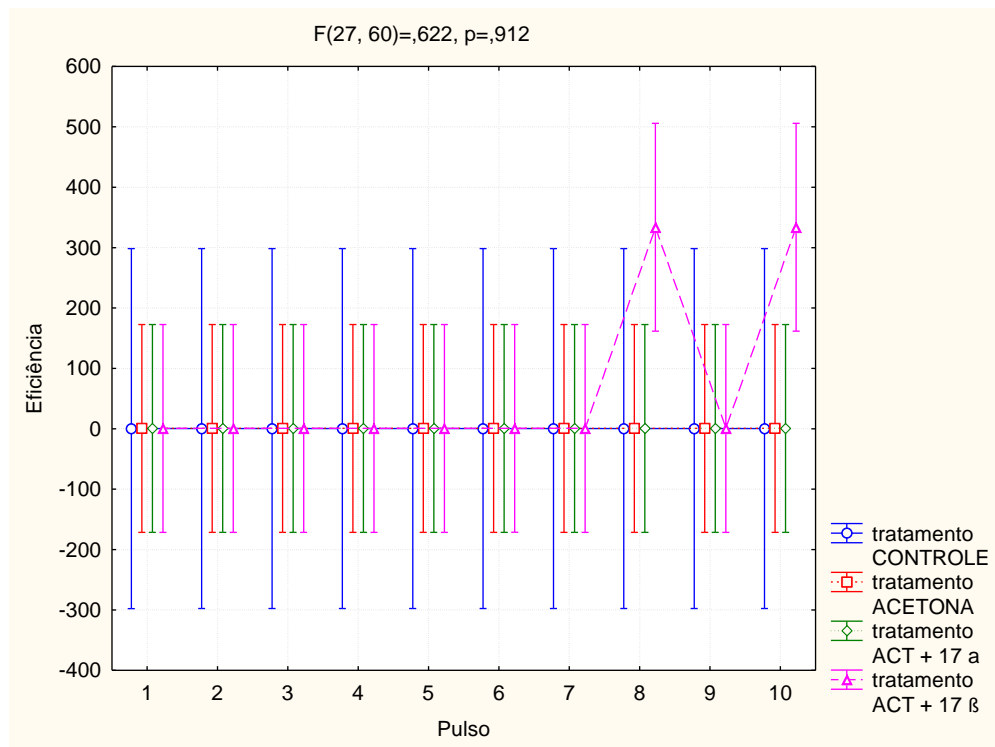


Gráfico 2. Interpretação: Comparação das eficiências fotossintéticas médias para 10 pulsos de luz nas duplicatas ($F(27,60) = 0,622$; $p = 0,912$), Teste 1 hora após adição, e uma hora no escuro. As barras denotam intervalo de confiança de 95% em torno da média. Não há diferenças entre as médias nem entre os pulsos de um mesmo tratamento, nem entre pulsos de tratamento distintos.

5.1.3 - AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA APÓS 24 HORAS DA ADIÇÃO DOS HORMÔNIOS

Após 24 horas, observou-se um aumento na eficiência fotossintética de forma significativa nas condições em que houve a adição de hormônios e acetona, quando comparado com o controle. Uma hipótese levantada para tal observação é o fato dos hormônios e acetona serem fonte de carbono para as algas do gênero *Euglena*

gracilis. Estas algas são capazes de metabolizar os carbonos orgânicos provenientes de várias fontes. Caso os carbonos se apresentem em baixas concentrações, tem-se um aumento da eficiência fotossintética (foto-autotrofia), enquanto que uma oferta em abundante concentração promove o crescimento celular – heterotrofia. Tal fenômeno é conhecido para glicose, aminoácidos e etanol (ROLLAND *et al.*, 2002). Em se tratando da acetona e dos estrógenos e derivados, nenhum estudo foi encontrado que apontasse que estes compostos fossem fontes de carbono que influenciasse a atividade das algas.

Considerando as fontes de carbono acetona e hormônios, nota-se que o meio em que se tinha apenas acetona e o meio contendo 17α etinilestradiol foram os que apresentaram melhor eficiência fotossintética, comparando-se estes dois meios com o meio tratado com 17β estradiol e controle. (**Gráfico 3**). Ainda é possível observar que no período de exposição de 24 horas, os meio tratados com acetona e o tratado com 17β estradiol apresentaram um decréscimo de eficiência ao longo da emissão dos dez pulsos de luz saturante. Tal fenômeno não é observado no meio contendo solução de 17α etinilestradiol, que apresentou neste período uma melhor adaptação à emissão contínua da luz saturante, a partir da emissão do quinto pulso, e se manteve constante até o décimo.

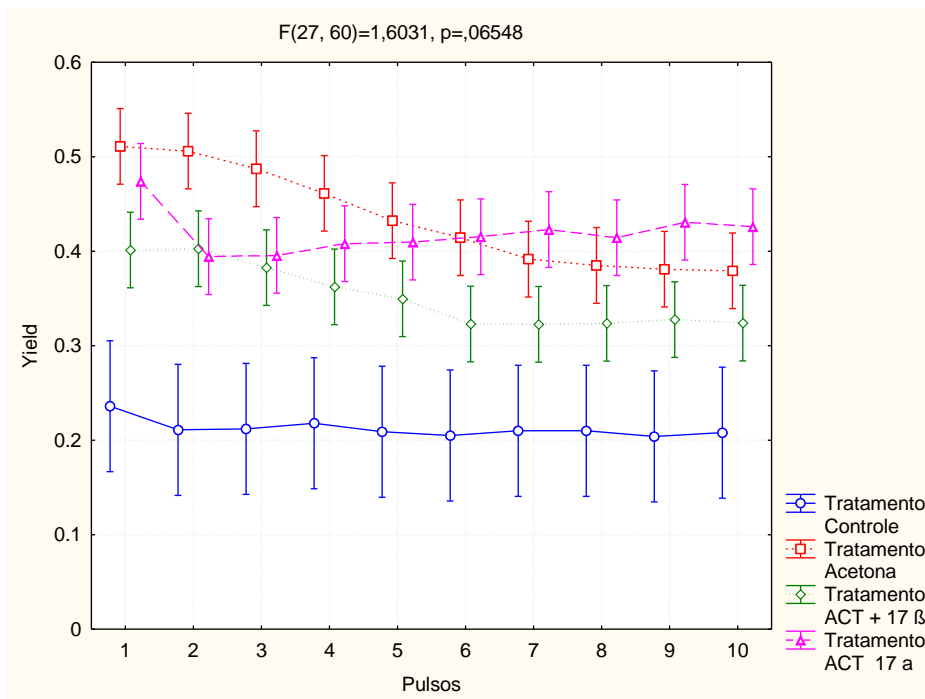


Gráfico 3. Comparação das eficiências fotossintéticas médias para 10 pulsos de luz nas duplicatas ($F(27, 60) = 1,6031$; $p = 0,06548$), teste 24 horas depois da adição, e uma hora no escuro. As barras denotam intervalo de confiança de 95% em torno da média. Não há diferenças entre as médias, nem entre os pulsos de um mesmo tratamento, mas há entre diferentes tratamentos, com desdobramentos apresentados no gráfico 4.

Considerando os valores médios ao longo de todo o teste — correspondente à emissão de 10 pulsos de luz saturante, observa-se que tanto o meio tratado apenas com acetona, como o meio tratado com acetona e 17 α etinilestradiol foram os que apresentaram melhores eficiências durante a exposição (**Gráfico 4**), sendo o meio contendo 17 α etinilestradiol como o que apresentou melhor adaptação a emissão de luz saturante, tendo uma provável fotoproteção induzida.

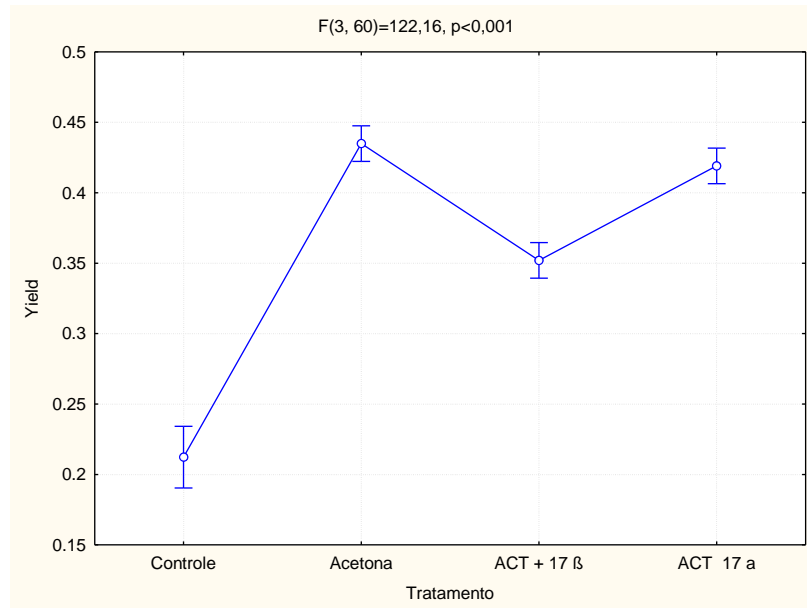


Gráfico 4. Comparação das eficiências fotossintéticas médias para os tratamentos ($F(3, 60) = 122,16, p < 0,001$), teste 24 horas depois da adição, e uma hora no escuro. As barras denotam intervalo de confiança de 95% em torno da média. Há diferenças entre as médias dos diferentes tratamentos, em relação às menores médias observadas para controle e ACT+17b, a maior média observada foi a do tratamento acetona.

5.1.4 - AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA APÓS 7 DIAS DA ADIÇÃO DOS HORMÔNIOS

Após sete dias de exposição às condições impostas, as culturas que receberam acetona e hormônios diluídos em acetona apresentaram eficiência superior ao controle, porém estatisticamente não significativos. (**Gráfico 5**).

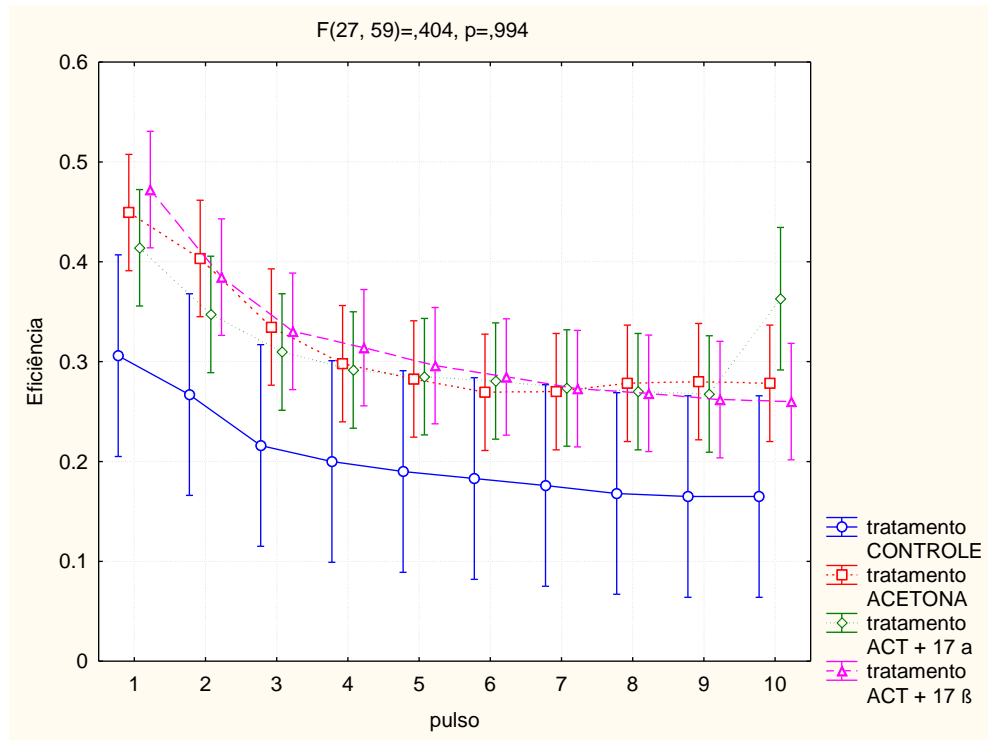


Gráfico 5. Comparação das eficiências fotossintéticas médias para 10 pulsos de luz nas duplicatas ($F(27, 59) = 404, p = 994$), teste 7 dias depois da adição, e uma hora no escuro. As barras denotam intervalo de confiança de 95% em torno da média. Não há diferenças entre as médias, nem entre os pulsos de um mesmo tratamento, nem entre pulsos de tratamento distintos.

Considerando as médias entre os dez pulsos de um mesmo tratamento, as eficiências nos grupos tratados foram significativamente superiores ao controle, mas sem diferença estatística relevante entre eles, conforme se observa no **Gráfico 6**. Tal condição pode estar associada ao fato de ainda se ter a presença de fonte de carbono suficiente para o incremento da atividade fotossintética. (FUJITA *et al.*, 2009).

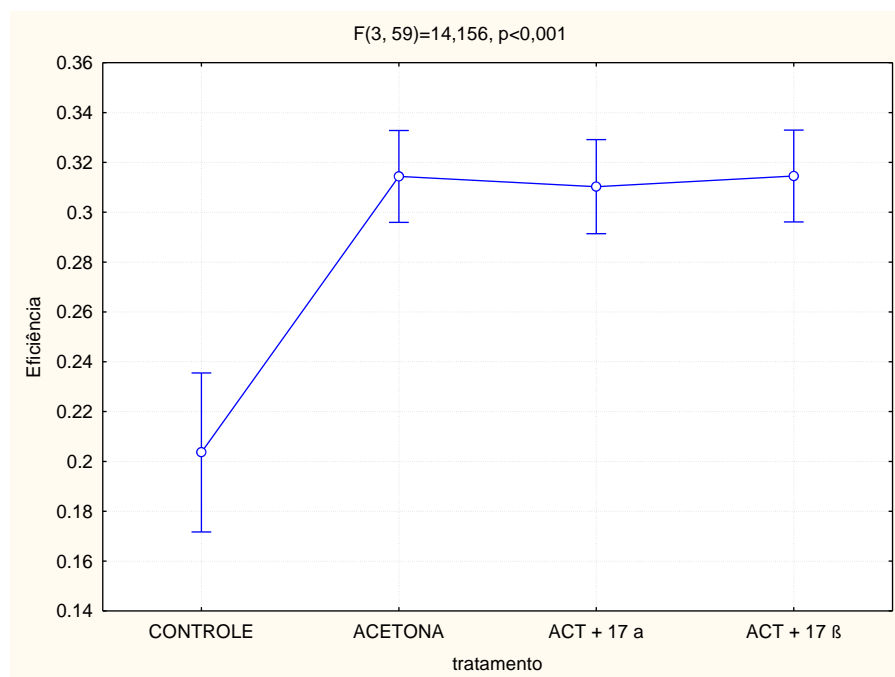


Gráfico 6. Comparação das eficiências fotossintéticas médias para os tratamentos ($F(3, 59) = 14,156, p < 0,001$), teste 7 dias depois da adição, e uma hora no escuro. As barras denotam intervalo de confiança de 95% em torno da média. Não há diferenças entre as médias dos seguintes tratamentos: acetona, ACT+17a e ACT+17b, entretanto, todos estes apresentaram médias de eficiências superiores aos valores obtidos para o controle.

5.1.5 - MÉDIA DAS EFICIÊNCIAS DURANTE TODO O TRATAMENTO

A média das eficiências durante todo o tratamento foi calculada a partir dos dados obtidos em cada série de emissão de luz actínia dentre todos os períodos. Para o primeiro pulso, por exemplo, fez-se a média obtida dos valores obtidos na leitura imediata, 24 horas e 7 dias; assim sucessivamente para os nove pulsos restantes. Durante todo o período de tratamento, nota-se que não houve alteração significativa entre as eficiências nas culturas contendo acetona pura e hormônios dissolvidos em acetona (**Gráfico 7**). Quando esta comparação foi feita com o controle notou-se que nesta condição houve um valor de eficiência inferior comparado com as demais culturas, mas não de forma significativa. A ausência de oferta de carbono provenientes dos hormônios e da acetona usada nas culturas talvez seja a explicação para a condição observada.

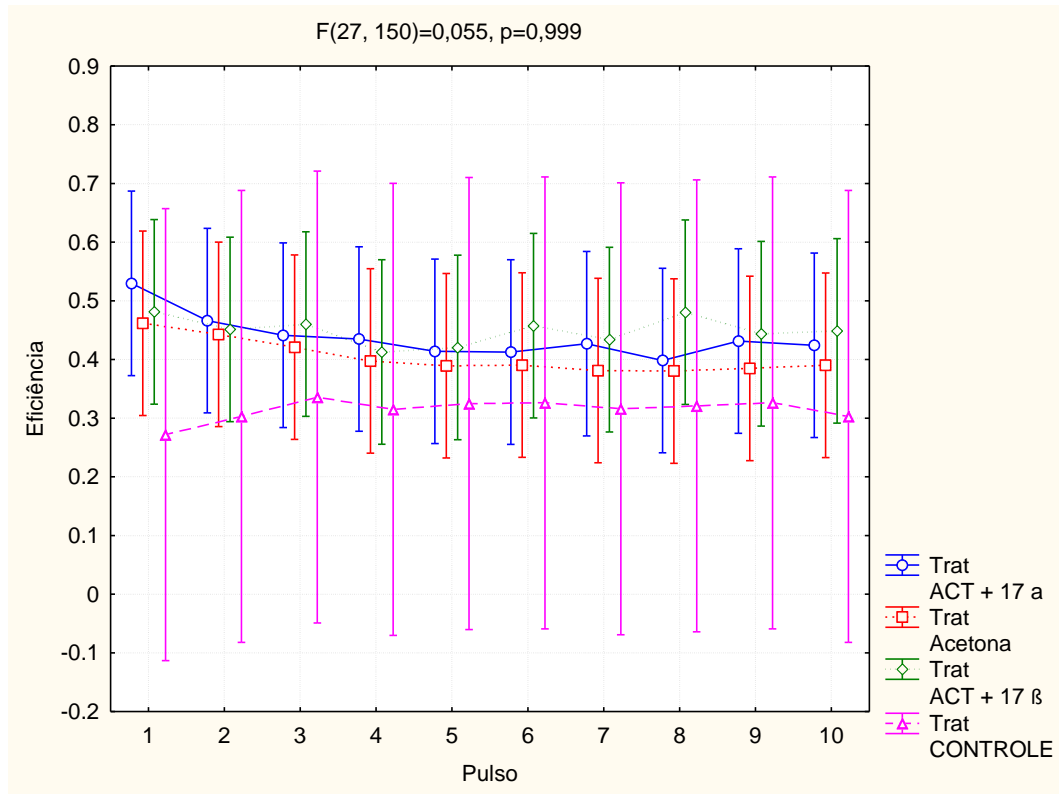


Gráfico 7. Comparação das eficiências fotossintéticas médias para 10 pulsos de luz dentro dos tratamentos e entre tratamentos ($F(27, 150) = 0,055, p = 0,999$). Cada intervalo de pulso denota a comparação entre os diferentes tratamentos, e como há sobreposição dos intervalos de confiança dos diferentes tratamentos (barras de diferentes cores), conclui-se que não há diferenças significativas no intervalo de cada pulso. Cada linha de cor diferente representa as variações de média ao longo da série temporal (pulsos de 1 a 10), e como há sobreposição dos intervalos de confiança dos diferentes tratamentos (barras de diferentes cores), conclui-se que não há diferenças significativas entre intervalo de cada pulso e de diferentes pulsos. As barras denotam intervalo de confiança de 95% em torno da média. Não há diferenças entre as médias, nem entre os pulsos de um mesmo tratamento, nem entre pulsos de tratamento distintos.

O **Gráfico 8** expressa o valor médio da eficiência entre os dez pulsos de um tratamento. Por exemplo: no teste imediato pegaram-se todos os dados de eficiência obtidos nos dez pulsos e fez-se a média. Logo, em seguida, fez-se a média dos valores encontrados nos períodos distintos (imediato, 1 hora, 24 horas e 7 dias). Observa-se que, durante todo o período de avaliação, os meios tratados com hormônios ou com acetona apenas foram significativamente superiores ao meio controle:

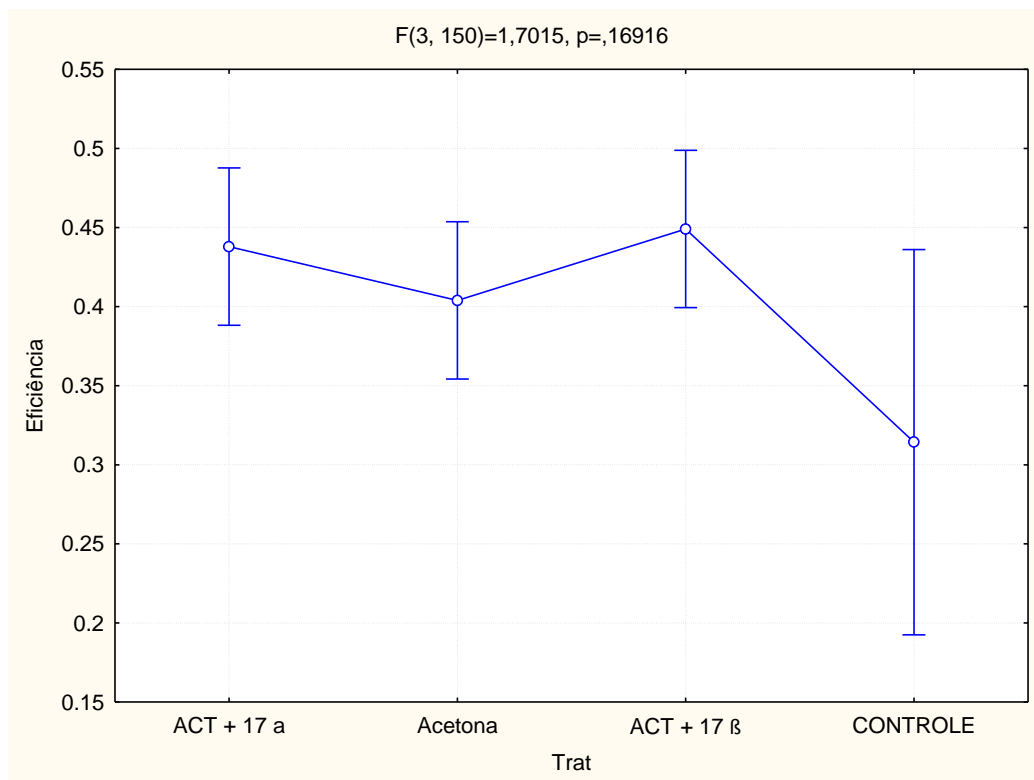


Gráfico 8. Comparação das eficiências fotossintéticas médias para os tratamentos ($F(3, 150) = 1,7015$; $p = 0,16916$). As barras denotam intervalo de confiança de 95% em torno da média. Não há diferenças entre as médias dos seguintes tratamentos: acetona, ACT+17a e ACT+17b; entretanto, todos estes apresentaram médias de eficiências superiores aos valores obtidos para o controle.

5.2 - AVALIAÇÃO DAS DISSIPAÇÕES NÃO FOTOQUÍMICAS QN E NPQ NA PRESENÇA DOS HORMÔNIOS

5.2.1- AVALIAÇÃO DAS DISSIPAÇÕES NÃO FOTOQUÍMICAS QN E NPQ LOGO APÓS A ADIÇÃO

Não houve detecção de dissipações nesta etapa, tanto nas culturas expostas aos hormônios solventes como no controle. Tal condição indica que este fenômeno foi independente e possivelmente associado à cinética de crescimento celular das algas.

5.2.2 - AVALIAÇÃO DAS DISSIPAÇÕES NÃO FOTOQUÍMICAS QN E NPQ 1HORA APÓS A ADIÇÃO DOS HORMÔNIOS

Quanto à dissipação de calor (qN e NPQ), que visa à geração de um mecanismo de fotoproteção por impedir o alcance rápido da fluorescência máxima (Fm), houve detecção de qN em todas as condições testadas, bem como a dissipação NPQ; inclusive no controle. Tal ocorrência indica que tal dissipação foi independente das condições impostas nos testes (**Gráfico 9 e 10**).

A hipótese para tal fenômeno é que estas dissipações estejam associadas à cinética de crescimento celular e fenômenos adaptativos próprios das algas. A detecção da dissipação de calor não fotoquímica qN indica que houve ativação de processos não fotoquímicos de emissão de fluorescência da clorofila, o que leva a dissipação de energia não radiativa principalmente na forma de calor. Sua ocorrência implica em uma criação de um gradiente transtilacoidal de pH a ativação de mecanismo regulatórios que evitam uso indevido da energia de excitação (ROHAČEK, 2002).

Mesmo sendo um fenômeno independente das condições impostas, notou-se que valores mais acentuados de qN foram encontrados nos meios contendo hormônios do que na controle (**Gráfico 10**). Embora não se possa afirmar que houve aumento desta dissipação pela ausência de testes antes e depois, o que se evidencia é que houve um comportamento diferenciado nas condições testadas, destoando do controle. Tal discrepância entre os testes e o controle pode estar associado à maior oferta de fonte de carbono - proveniente da acetona e dos hormônios - que contribui para a ativação de mecanismos regulatórios que evitariam o uso indevido da energia de excitação. (OGBONNA *et al.*, 2002).

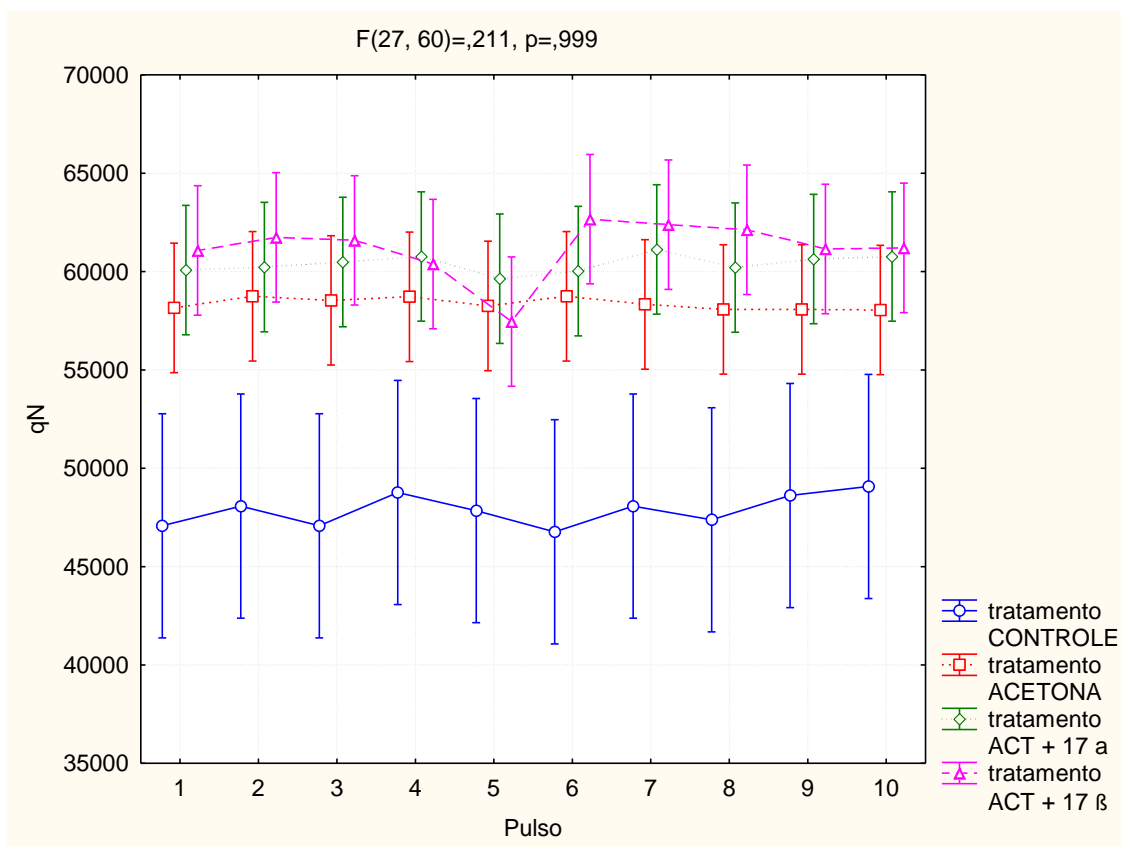


Gráfico 9. Comparação das extinções não fotoquímicas (qN) médias para 10 pulsos de luz nas duplicatas ($F(27, 60) = 211; p = 999$), teste 1 hora após adição, e uma hora no escuro. As barras denotam intervalo de confiança de 95% em torno da média. Não há diferenças entre as médias, nem entre os pulsos de um mesmo tratamento, nem entre pulsos de tratamento distintos. Entretanto, é possível observar que o tratamento controle apresentou as menores médias de qN durante todos os pulsos.

Quanto a dissipação NPQ, esta foi detectada, porém sem diferença significativa entre os testes realizados e o controle (**Gráfico 10**). A dissipação NPQ, é conhecida como “dissipação de *Stern Volmer*,” e se diferencia da qN pelo fato de envolver a formação de zeaxantina, um composto carotenoide antioxidante responsável pela proteção de membranas celulares. (ROHAČEK, 2002).

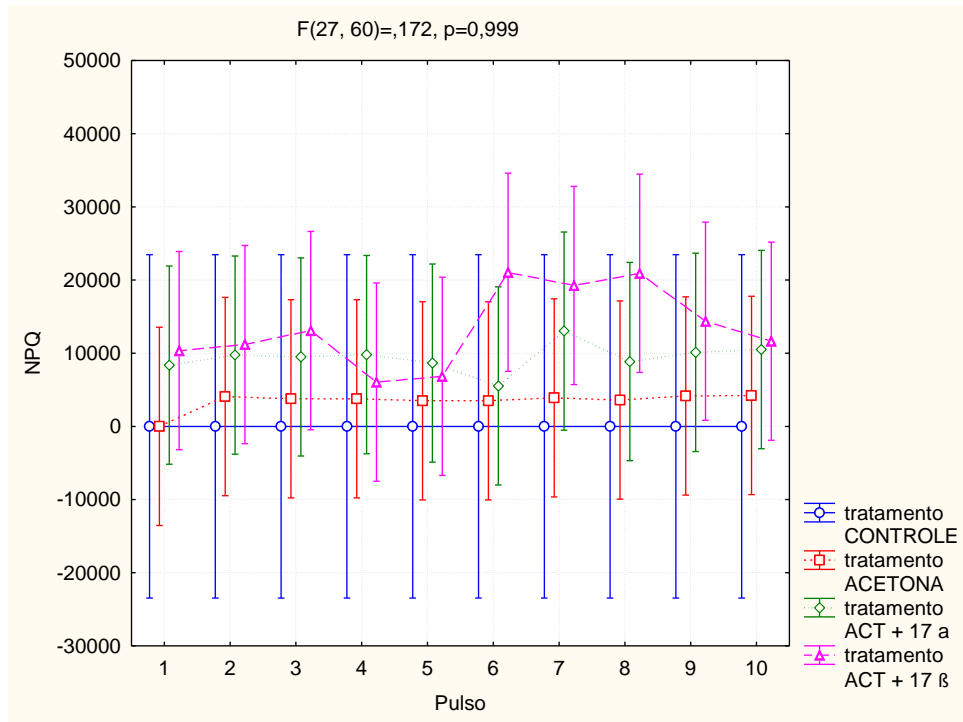


Gráfico 10. Comparação das NPQ médias para 10 pulsos de luz nas duplicatas ($F(27, 60) = 1,172$; $p = 0,999$), teste 1 hora após adição, e uma hora no escuro. As barras denotam intervalo de confiança de 95% em torno da média. Não há diferenças entre as médias, nem entre os pulsos de um mesmo tratamento, nem entre pulsos de tratamento distintos.

5.2.3 - AVALIAÇÃO DAS DISSIPAÇÕES NÃO FOTOQUÍMICAS QN E NPQ 24 HORAS APÓS A ADIÇÃO DOS HORMÔNIOS

Neste período de exposição observou-se a detecção de qN e NPQ, indicando haver neste período um decréscimo da fluorescência máxima (F_m) durante a exposição das amostras à luz actínia.

Comparando-se às taxas de NPQ entre os hormônios investigados, não foram encontradas diferenças significativas entre os valores de NPQ para 17α etinilestradiol e 17β estradiol. (**Gráfico 11**). Nos testes que avaliaram as médias no tratamento (entre os 10 pulsos), os valores aumentados desta dissipação foram encontrados de forma significativa nos meios contendo os hormônios em relação aos meios com solvente puro e controle. (**Gráfico 12**). Comparando-se os resultados

de dissipação encontrados na exposição aos hormônios, nota-se não existir diferença significativa entre eles, mas quando compara-se o resultado dos hormônios com o solvente puro e o controle, nota-se que tanto o 17 α etinilestradiol quanto o 17 β estradiol tiveram valores significativamente superiores. Isto sugere que a presença de 17 α etinilestradiol e 17 β estradiol influenciou de alguma forma o aumento da dissipação de NPQ nesta etapa, e conseqüentemente de zeaxantina e outros carotenos.

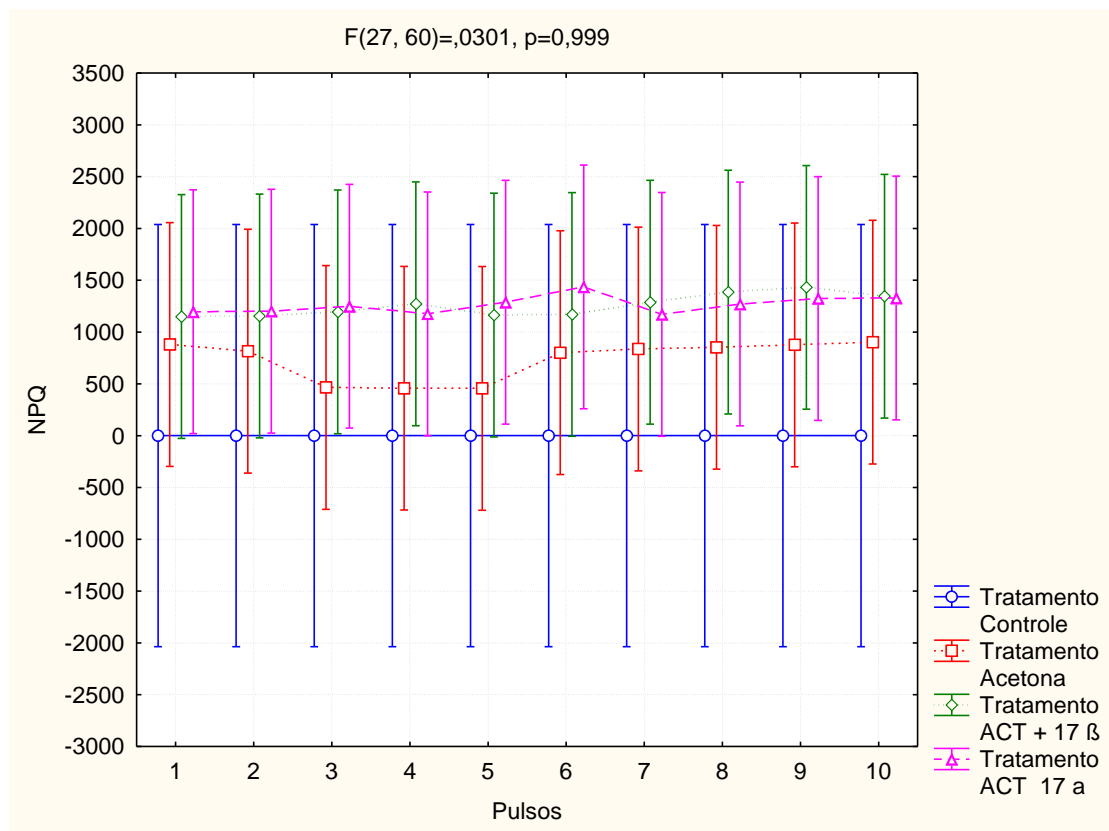


Gráfico 11. Comparação das NPQ médias para 10 pulsos de luz nas duplicatas ($F(18,60) = 0,042$; $p=1,000$), teste 24 horas depois da adição, e uma hora no escuro. As barras denotam intervalo de confiança de 95% em torno da média. Não há diferenças entre as médias, nem entre os pulsos de um mesmo tratamento, nem entre pulsos de tratamento distintos.

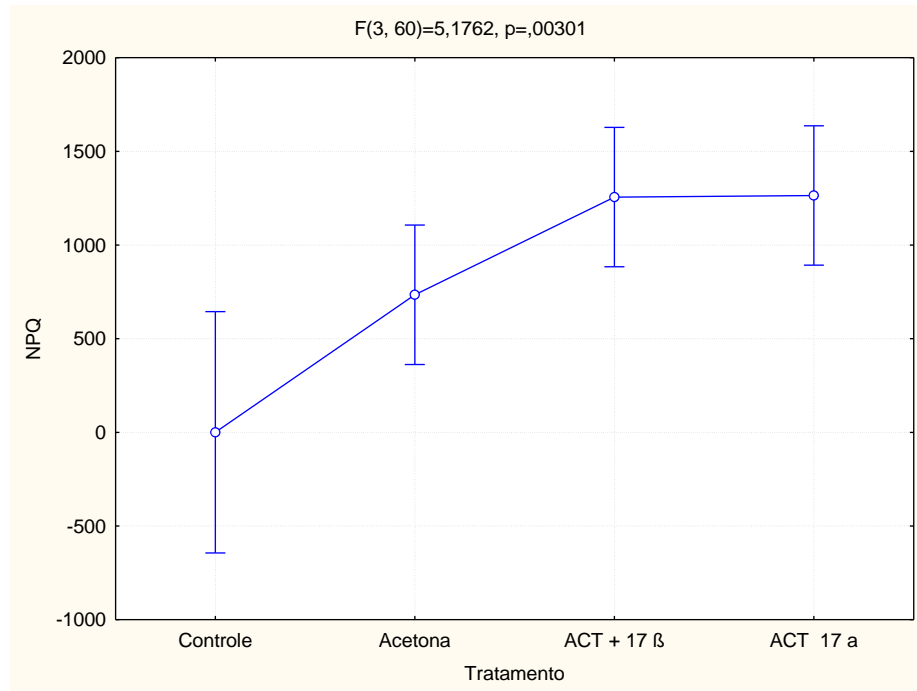


Gráfico 12. Comparação das eficiências fotossintéticas médias para os tratamentos ($F(3, 60) = 5,1762$; $p = 0,00301$), teste 24 horas depois da adição, e uma hora no escuro. As barras denotam intervalo de confiança de 95% em torno da média. Há diferenças entre as médias dos diferentes tratamentos, em relação às menores médias observadas para controle e acetona, com os valores assumindo uma assíntota entre 1000 e 1500. Não há diferenças significativas entre ACT+17a e ACT+17b.

Quanto a dissipação qN, observou-se a ocorrência de valores superiores nos grupos testes em relação ao controle, porém, sem significância entre os grupos testados. (**Gráfico 13**).

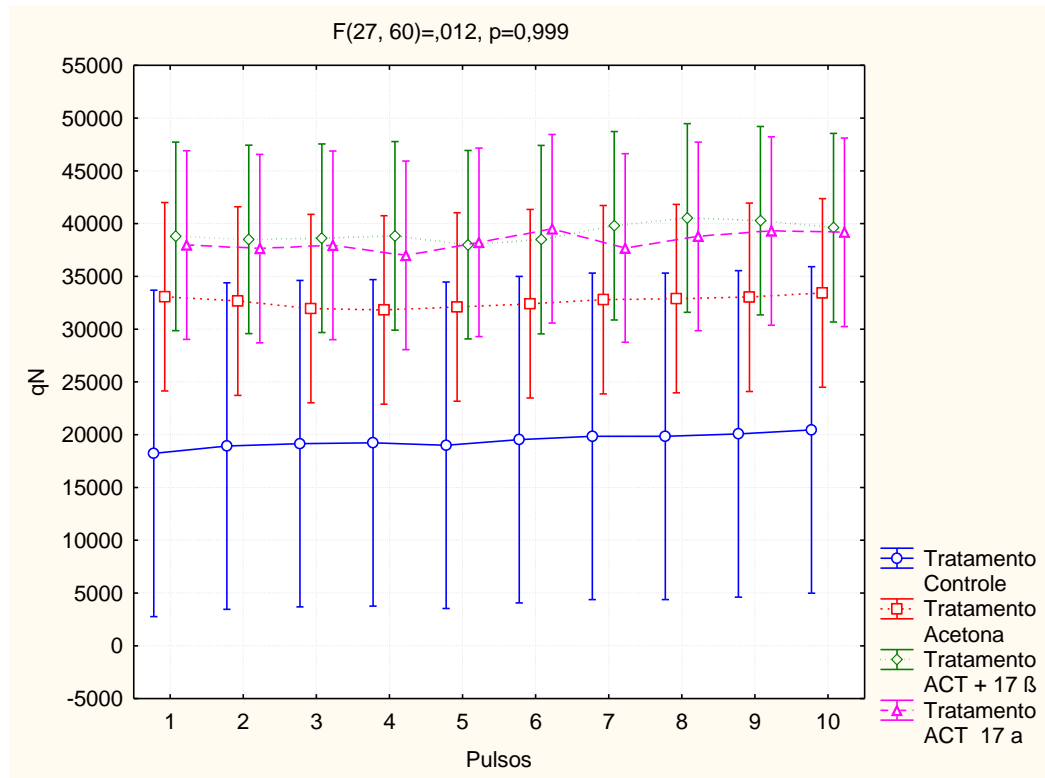


Gráfico 13. Comparação das extinções não fotoquímicas (qN) médias para 10 pulsos de luz nas duplicatas ($F(18,60) = 0,012; p = 0,999$), teste 24 horas depois da adição, e uma hora no escuro. As barras denotam intervalo de confiança de 95% em torno da média. Não há diferenças entre as médias, nem entre os pulsos de um mesmo tratamento, nem entre pulsos de tratamento distintos.

5.2.4 - AVALIAÇÃO DAS DISSIPAÇÕES NÃO FOTOQUÍMICAS QN E NPQ 7 DIAS APÓS A ADIÇÃO DOS HORMÔNIOS

Com relação à dissipação qN e NPQ, estas não foram detectadas neste período de teste (7 dias), tanto no controle quanto nas condições testadas. Trata de evento independente, evidenciado pelo comportamento do controle. Tal condição pode estar associada à cinética de crescimento celular, ou está relacionada ao decréscimo temporal em função da escassez de fontes de carbono devido ao seu consumo, bem como a perda das propriedades antioxidantes pela metabolização dos hormônios.

5.2.5 - MÉDIA DAS EFICIÊNCIAS DURANTE TODO O TRATAMENTO

A análise entre os tratamentos compreende a análise das condições impostas ao longo de todo o período de teste (7 dias), sendo computadas as médias dos valores encontrados para cada pulso, conforme sua sequência de emissão. Para a resposta ao primeiro pulso energético de luz saturante emitida, em todas as condições temporais, fez-se a média; tanto para a eficiência quanto para as dissipações. Objetivou-se, assim, obter uma visão geral do processo dentro do intervalo de tempo estipulado.

Quanto às dissipações, a ocorrência do fenômeno NPQ foi o que apresentou alterações nas médias durante todo o período de estudo, considerando os valores médios obtidos por ordem de emissão dos pulsos saturantes, bem como a média dos dez pulsos estipulados para o experimento. Na primeira condição citada, não houve variação significativa, conforme se pode observar no **Gráfico 14**:

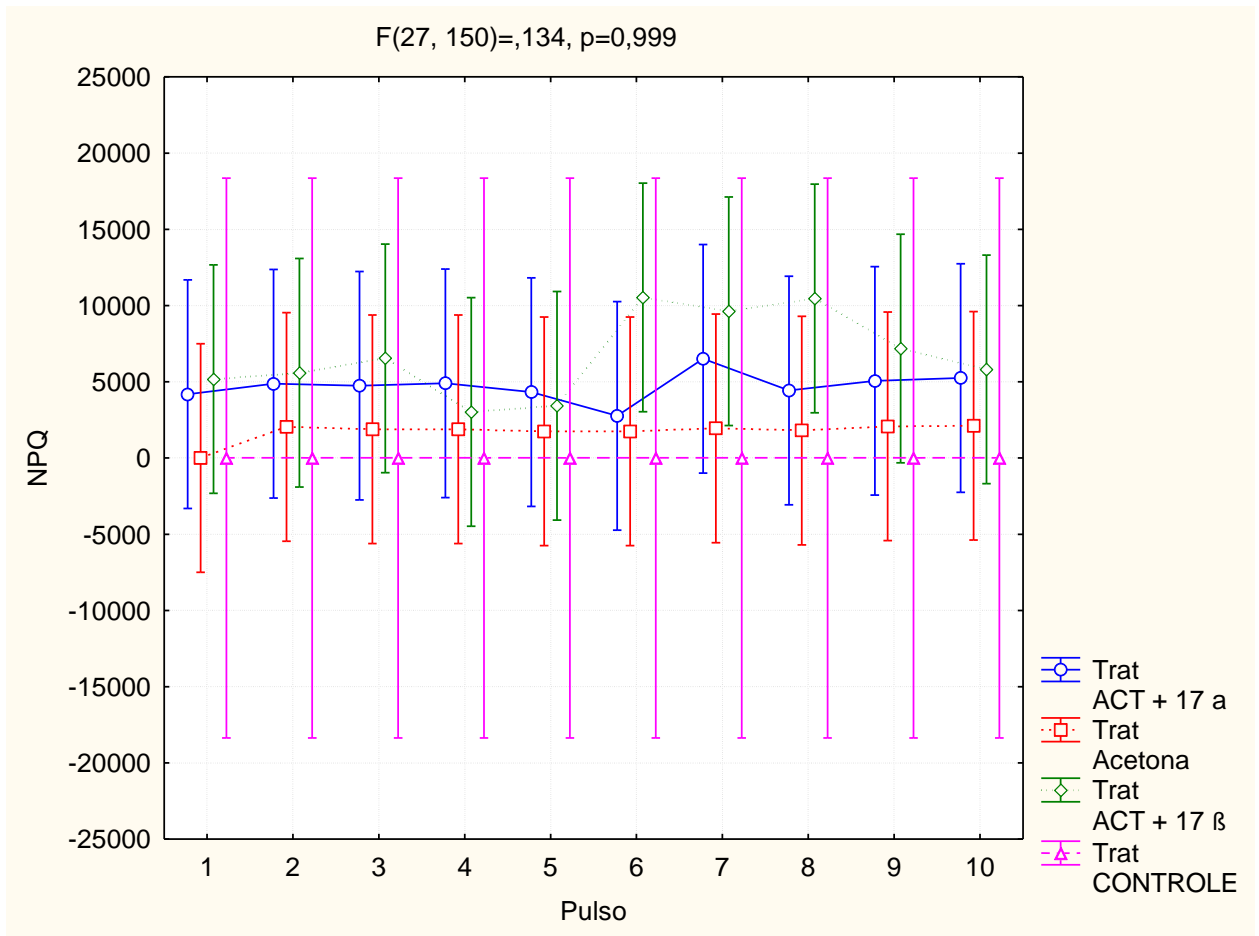


Gráfico 14. Comparação das NPQ médias para 10 pulsos de luz dentro dos tratamentos e entre tratamentos ($F(27, 150) = 134; p = 0,999$). Cada intervalo de pulso denota a comparação entre os diferentes tratamentos, e como há sobreposição dos intervalos de confiança dos diferentes tratamentos (barras de diferentes cores), conclui-se que não há diferenças significativas no intervalo de cada pulso. Cada linha de cor diferente representa as variações de média ao longo da série temporal (pulsos de 1 a 10), e como há sobreposição dos intervalos de confiança dos diferentes tratamentos (barras de diferentes cores), conclui-se que não há diferenças significativas entre intervalo de cada pulso e de diferentes pulsos. As barras denotam intervalo de confiança de 95% em torno da média. Não há diferenças entre as médias, nem entre os pulsos de um mesmo tratamento, nem entre pulsos de tratamento distintos.

No entanto, na segunda condição em que se avaliou a média entre os dez pulsos emitidos em todos os períodos propostos no cronograma (Figura 7), houve uma variação significativamente superior das condições em teste quando comparada ao controle, sendo que a condição 17 β estradiol em acetona ainda apresentou uma variação significativa em relação aos testes feitos com acetona e controle. (**Gráfico 15**). Tal condição não implicou necessariamente em aumento da

eficiência, mas indica que a cultura que recebeu 17 β estradiol estaria mais propensa a fotoproteção e à formação de zeaxantina. Tal fenômeno pode ser explicado pela ação antioxidante deste hormônio, que contribui para o fenômeno de fotoproteção envolvendo a dissipação de calor.

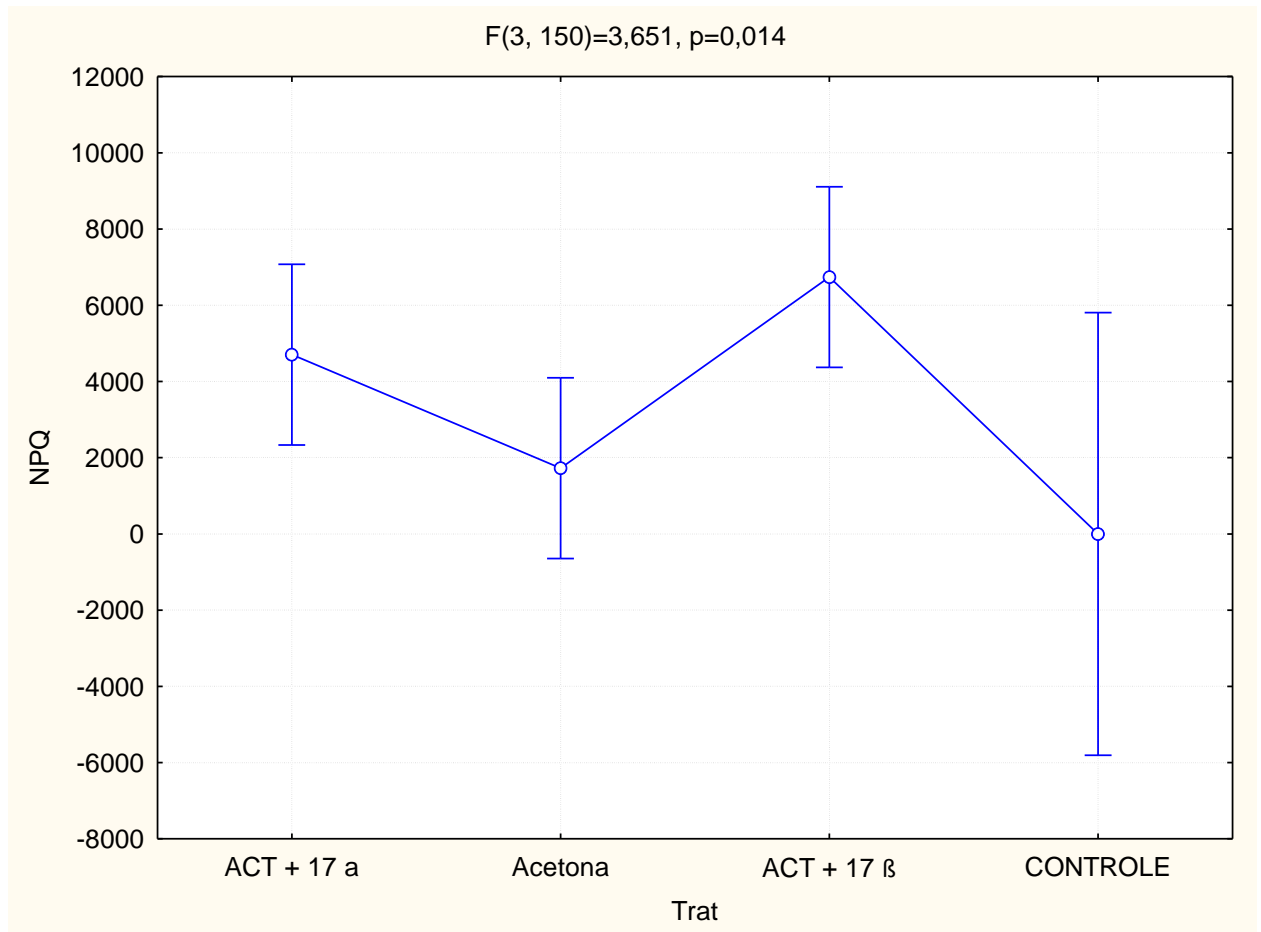


Gráfico 15. Comparação das NPG médias para os tratamentos ($F(3, 150) = 3,651; p = 0,014$). As barras denotam intervalo de confiança de 95% em torno da média. A comparação par a par das médias e intervalos de confiança sugere que o tratamento ACT+17b apresenta média significativamente maior do que o tratamento acetona e o tratamento controle.

6. EXTRAÇÃO DE CLOROFILA

A extração de clorofila foi feita conforme descrito no capítulo matérias e métodos desta dissertação, e as análises foram feitas 24 horas e 7 dias após o tratamento proposto. Os espectros obtidos deram subsídio para os cálculos de

concentração de clorofila e de luteínas na amostra, utilizando-se as fórmulas de Lorenz para clorofila e Lamber-Beer para caratenoides.

6.1- DETERMINAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES DE CLOROFILA FRENTE À EXPOSIÇÃO DE HORMÔNIOS.

A determinação da clorofila a foi realizada por espectrofotometria no UV-visível, pela leitura da absorvância do extrato etanólico de clorofila no comprimento de onda de 665nm e 705nm, λ_{max} de absorção da clorofila em etanol. A concentração total de clorofila foi calculada pela equação de Lonrezen:

$$\text{Clorofila a} = [11,4 \times K \times (A_{665} - A_{750}) - 1,54 (A_{645} - A_{750} \times V_1/(V_2 \times I))$$

No qual se tem:

A₆₆₅	Absorvância a 665 nm antes da acidificação
A_{665A}	Absorvância a 665 nm após a acidificação
A₇₅₀	Absorvância a 750 nm antes da acidificação
A_{750A}	Absorvância a 750 nm após a acidificação
K	Factor que equaciona a redução da absorvância na concentração inicial de clorofila a após acidificação = $R/(R-1) = 2,43$
R	Razão máxima de absorvância de A_{665}/A_{665A} na ausência de feopigmentos (= 1,7)
V₁	Volume de acetona a 90% utilizado na extracção (ml)
V₂	Volume da amostra filtrada (l)
I	Percurso óptico da célula do espectrofotómetro (cm)

As variações das concentrações foram expressas no **Gráfico 16**:

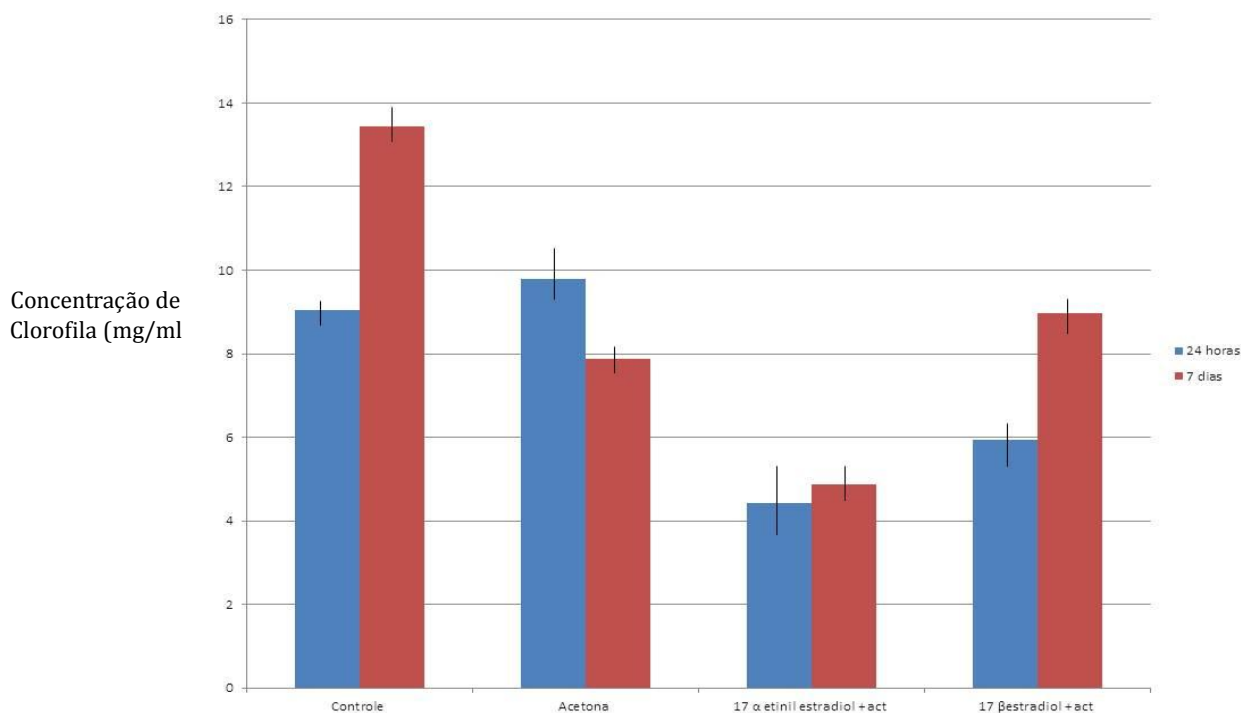


Gráfico 16: Cálculo da concentração de clorofila 24 horas após a adição do hormônio e 7 dias após a adição. As barras denotam intervalo de confiança de 95% em torno da média

Observando-se as concentrações de clorofila em todas as condições testadas, nota-se que o controle teve um comportamento de aumento significativo de cerca de 40% entre o primeiro e sétimo dia de análise. Tal condição pode estar associada à cinética de crescimento das culturas celulares, sendo teoricamente esperado para todas as outras condições, visto que são originárias de uma mesma cultura mãe. Na presença de acetona, por sua vez, nota-se um decréscimo na concentração de clorofila. Apesar de se ter uma provável melhora na eficiência fotossintética, quando comparada com o controle em função da oferta de fonte de carbono extra, a concentração de clorofila decresceu na presença apenas deste solvente. Na presença de hormônios, o 17 α etinilestradiol, não houve diferença significativa entre os valores de concentração de clorofila, enquanto que na condição em que houve exposição a 17 β estradiol houve valor significativo no aumento da

concentração de clorofila encontrada. Tal resultado não implica um aumento da concentração em função da exposição hormonal, pois o controle teve um comportamento similar ao encontrado pelo 17 β estradiol, mas quando se compara este hormônio com o 17 α etinilestradiol, percebe-se que este apresentou um comportamento diferenciado, não permitindo um crescimento semelhante ao apresentado pelo controle. E quando se compara ainda os dois hormônios com a condição, envolvendo apenas a acetona, é possível notar que o solvente sozinho induziu uma redução na concentração de clorofila, fenômeno este suprimido de alguma forma pela presença dos hormônios. Uma explicação plausível para tal fenômeno é a ação antioxidante destes hormônios, o que levou a uma proteção e preservação das clorofilas presentes.

6.2 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CAROTENOIDES FRENTE À EXPOSIÇÃO DE HORMÔNIOS

A determinação dos carotenoides totais foi realizada por espectrofotometria no UV-vísível, pela leitura da absorbância do extrato etanólico de carotenoides no comprimento de onda de 445 nm, λ_{max} de absorção da luteína em etanol. A concentração de carotenoides totais foi calculada a partir da Lei de Lambert – Beer:

$$C (\mu\text{g mL}^{-1}) = \frac{A \times 10^4}{E_{1\text{cm}}^{1\%}}$$

Onde C é a concentração total de carotenoides totais (expressa como luteínas); A é a absorbância do extrato a 445 nm e $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ é o coeficiente da absorvidade da luteína em etanol a 2550. Os resultados estão expressos no **Gráfico 17**.

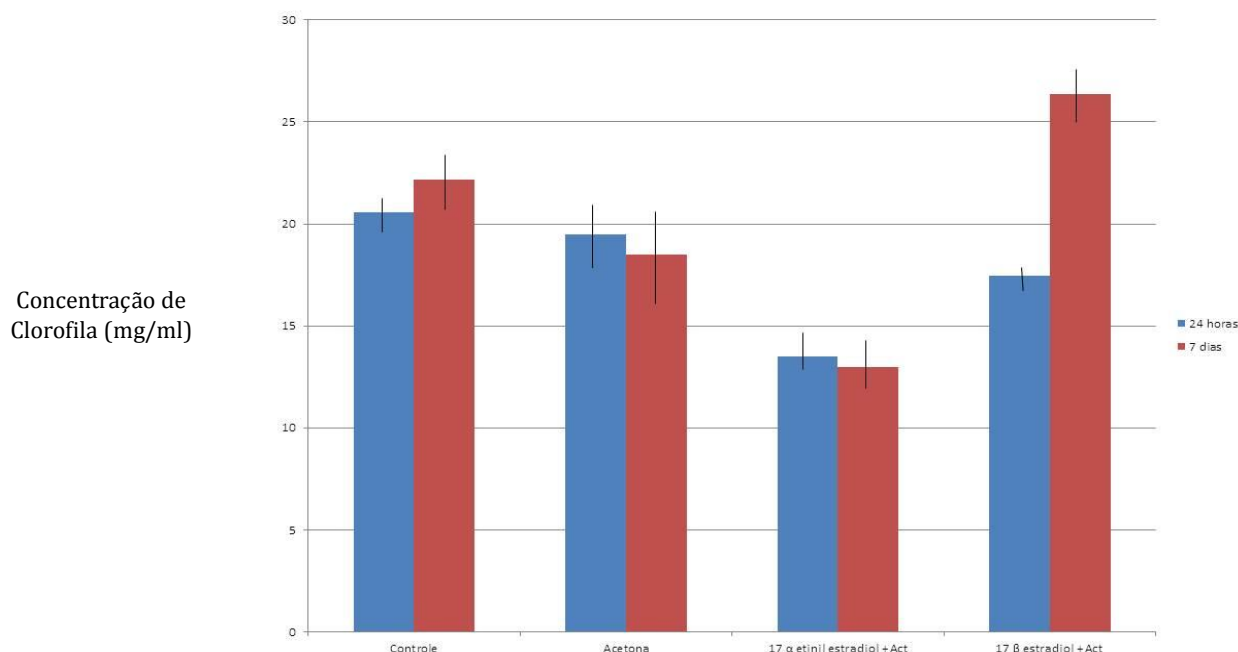


Gráfico 17: Concentração de carotenoides 24 horas após a adição de hormônios e 7 dias após a adição dos hormônios. As barras denotam intervalo de confiança de 95% em torno da média

No caso dos carotenoides, observa-se que apenas o meio tratado com 17 β estradiol apresentou alteração significativa durante o intervalo de tempo tratado. É importante ressaltar que este hormônio foi o que apresentou alteração significativa também na dissipação NPQ, e que este fenômeno está intimamente ligado à produção de zeaxantina, um importante antioxidante que exerce fotoproteção às células. Tal condição sugere que quando as algas ficam expostas a 17 β estradiol, um mecanismo de fotoproteção via zeaxantina vinculado a um aumento de NPQ leva a uma preservação de uma possível cinética de aumento da concentração de clorofila no meio, mesmo em condições adversas, diferente do hormônio sintético 17 α etinilestradiol. Tal condição deve estar associada ao potencial antioxidante que o hormônio 17 β estradiol apresenta; sendo estas características superiores ao seu análogo sintético.

7. ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DAS ALGAS E. GRACILIS EM ENSAIO DE BIOMONITORAMENTO EM TEMPO REAL VIA NG TOX

A análise do comportamento das algas frente à presença dos hormônios se deu nos períodos de 24 horas e 7 dias. A concentração considerada neste caso foi a descrita anteriormente, sendo 0,0001 mg/ml para os hormônios em teste, e 0,785 mg/ml de acetona.

7.1- ESTUDOS DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS FRENTE À PRESENÇA DE 17 α ETINILESTRADIOL E 17 β ESTRADIOL

7.1.1 – ANÁLISE DA COMPACTAÇÃO DAS ALGAS

A compactidade (compactação celular) apresentou uma inibição significativa apenas para a condição exposta ao hormônio 17 β estradiol no sétimo dia. (**Gráfico 19**). Nas demais condições, não houve alteração significativa. (**Gráficos 18 e 19**). Células mais compactas sugerem um choque transitório no meio provocado principalmente por eventos relacionados à osmose.

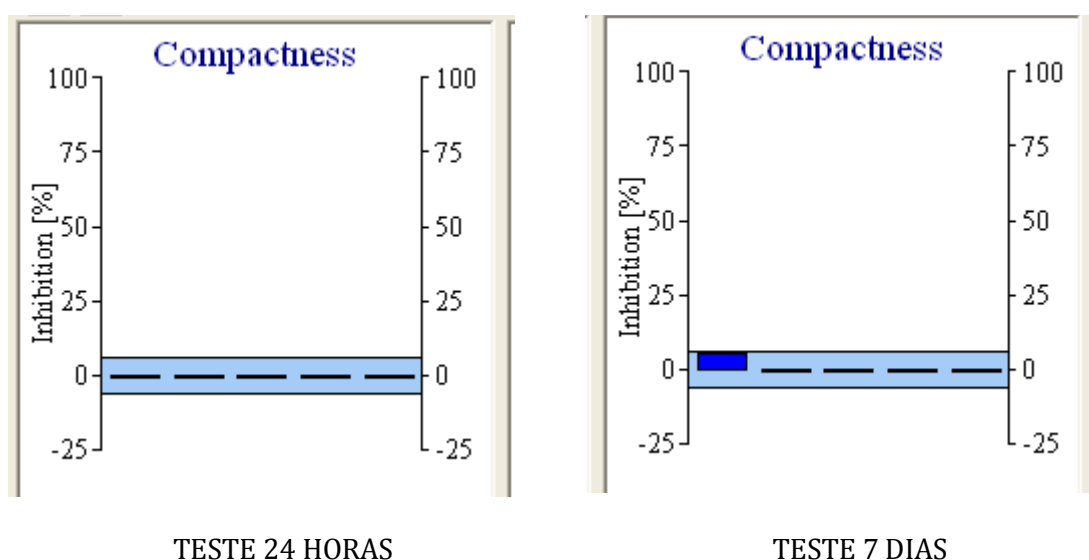


Gráfico 18: Inibição da compactação celular frente à exposição ao hormônio 17 α etinilestradiol 24

horas e 7 dias após exposição ao hormônio. Barra em vermelho indica alteração significativa ($P < 0,005$). Gráficos gerados pelo sistema ImagingTox. Teste realizado em duplicata.

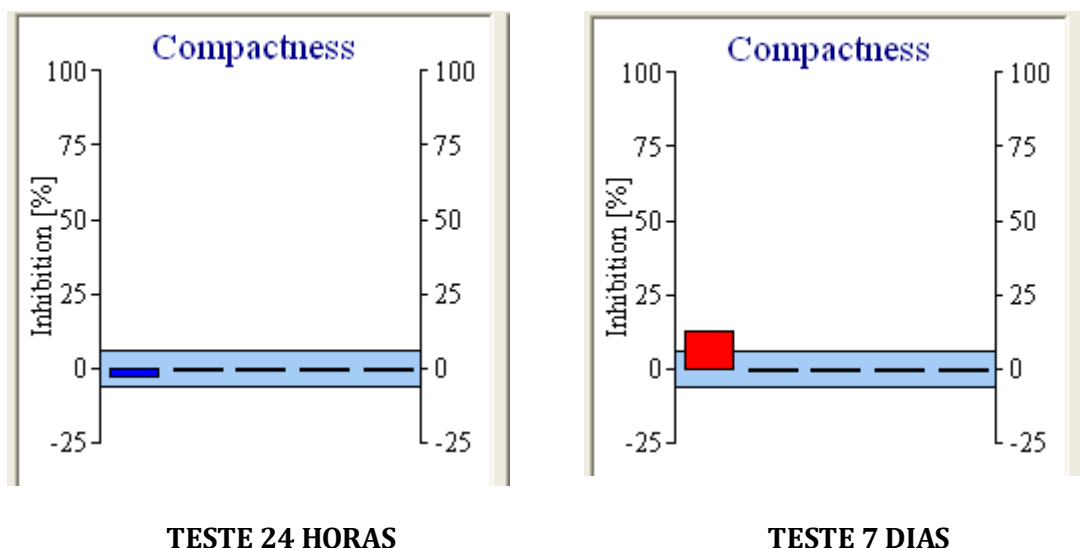


Gráfico 19: Inibição da compactação celular frente a exposição ao hormônio 17 β estradiol 24 horas e 7 dias após exposição ao hormônio. Barra em vermelho indica alteração significativa ($P < 0,005$). Gráficos gerados pelo sistema ImagingTox. Teste realizado em duplicata.

7.1.2 – ANÁLISE DA VELOCIDADE MÉDIA DAS ALGAS

Em ambos os períodos analisados, para as condições testadas, observa-se uma inibição significativa da velocidade média das algas, exceto para a exposição a 17 α etinilestradiol no período de 24 horas. (**Gráfico 20**). Tanto na exposição a 17 α etinilestradiol, quanto a exposição a 17 β estradiol, foi observada uma inibição mais acentuada no sétimo dia, quando comparado com a análise do primeiro dia. O hormônio 17 β estradiol foi o que apresentou inibição mais intensa quando comparado com as demais condições. (**Gráfico 21**). A inibição da velocidade pode servir como um indicador de toxicidade, pois significa uma influência sobre o uso de energia da célula ou o metabolismo em geral.

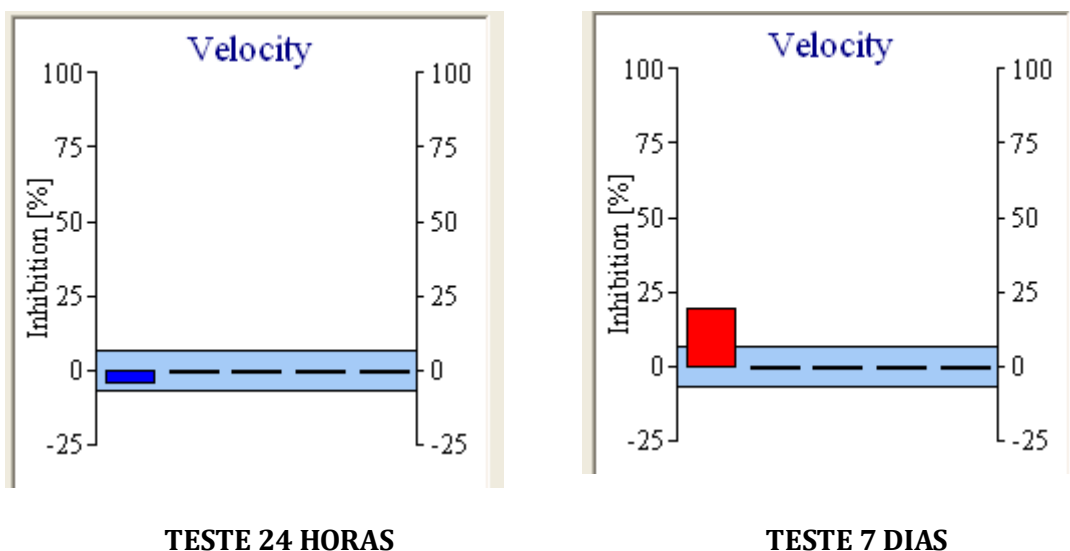


Gráfico 20: Inibição da velocidade média celular frente à exposição ao hormônio 17 α etinilestradiol 24 horas e 7 dias após exposição ao hormônio. Barra em vermelho indica alteração significativa ($P < 0,005$). Gráficos gerados pelo sistema ImagingTox. Teste realizado em duplicata.

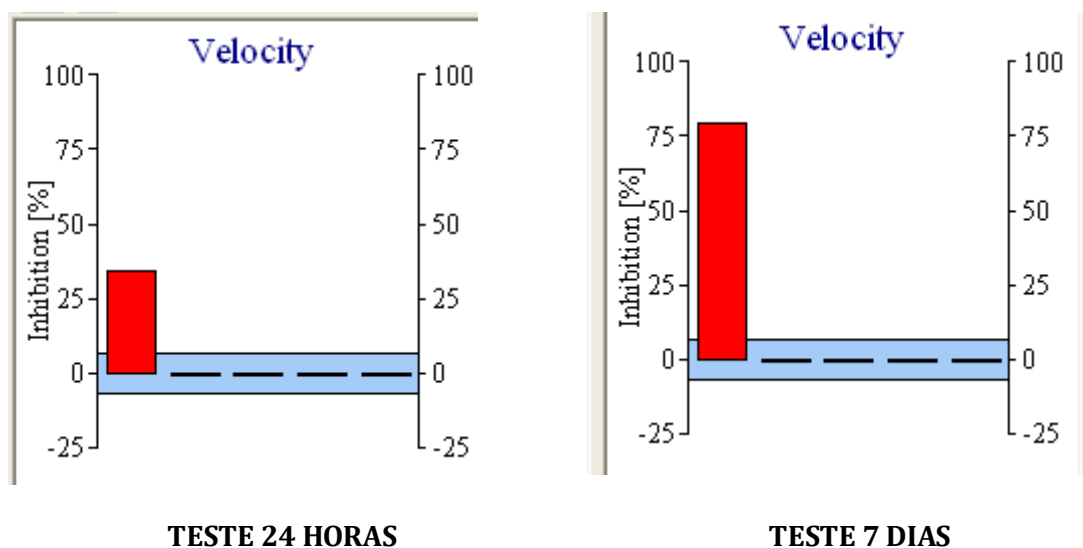


Gráfico 21: Inibição da velocidade média celular frente à exposição ao hormônio 17 β estradiol 24 horas e 7 dias após exposição ao hormônio. Barra em vermelho indica alteração significativa ($P < 0,005$). Gráficos gerados pelo sistema ImagingTox. Teste realizado em duplicata.

7.1.2.1 – ANÁLISE DA VELOCIDADE MÉDIA DE SUBIDA À SUPERFÍCIE DAS ALGAS

A análise referente ao comportamento de movimento para a superfície das algas demonstrou alterações significativas em ambas as condições, de forma superior ao controle e ao meio contendo apenas acetona. (**Gráficos 22 e 23**). Esta inibição no movimento para a superfície tem relevância para organismos fotossintéticos aquáticos, pois compromete o desempenho fotossintético em função da dificuldade de se chegar mais próximo da superfície e do contato com a luz. Tal condição é sugestiva para que na exposição crônica destes hormônios as algas possam sofrer algum tipo de alteração de caráter tóxico.

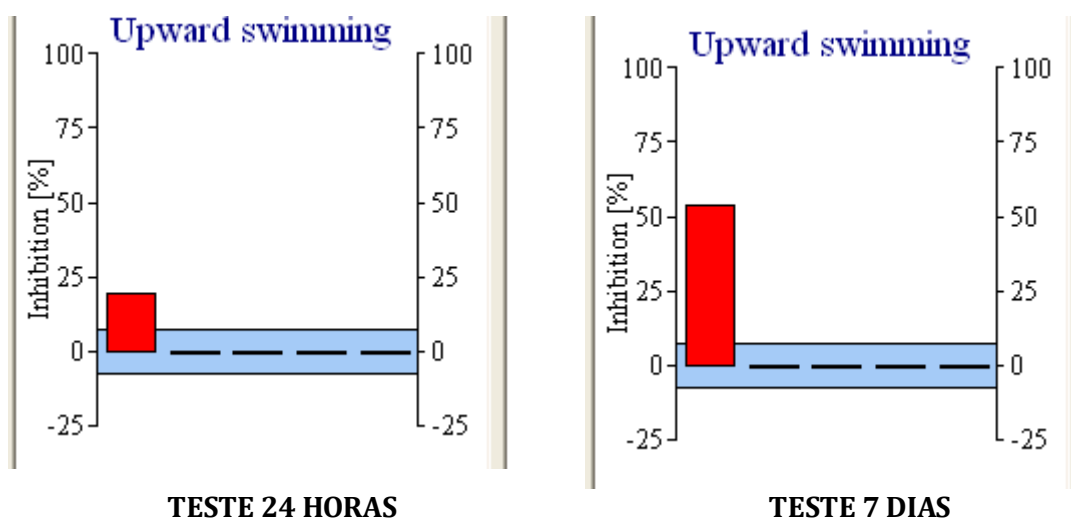


Gráfico 22: Inibição da velocidade média de subida à superfície frente à exposição ao hormônio 17α etinilestradiol 24 horas e 7 dias após exposição ao hormônio. Barra em vermelho indica alteração significativa ($P < 0,005$). Gráficos gerados pelo sistema ImagingTox. Teste realizado em duplicata.

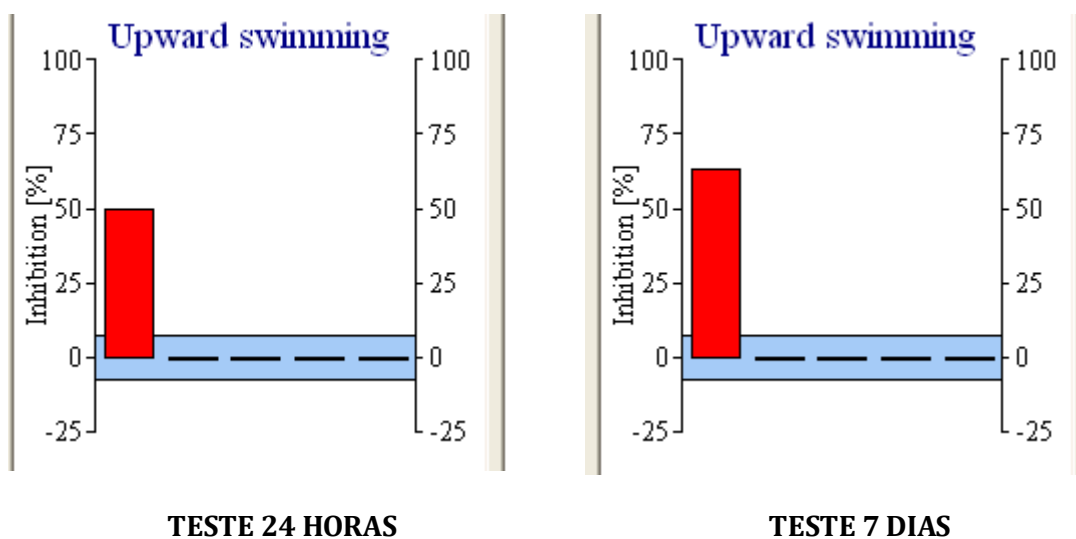
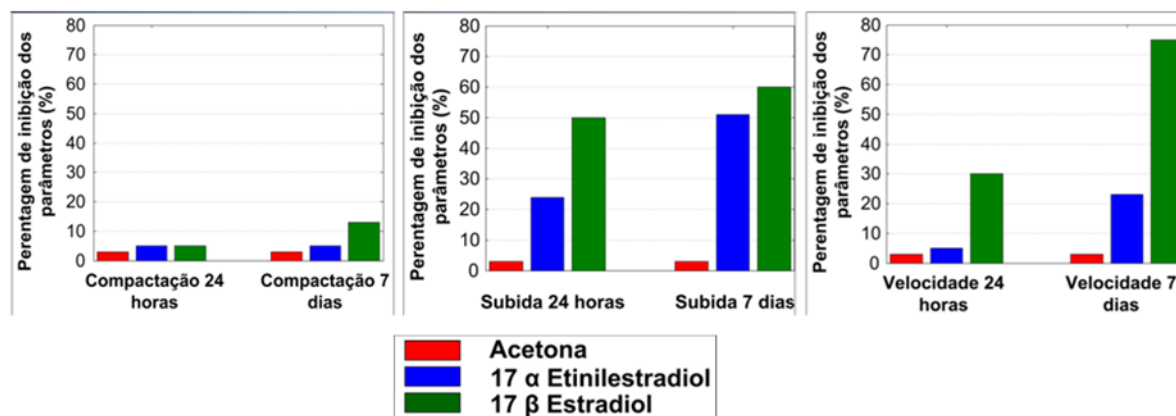


Gráfico 23: Inibição da velocidade média de subida à superfície frente à exposição ao hormônio 17β estradiol 24 horas e 7 dias após exposição ao hormônio. Barra em vermelho indica alteração significativa ($P < 0,005$). Gráficos gerados pelo sistema ImagingTox. Teste realizado em duplicata.

7.1.2.2 – ANÁLISE COMPARATIVA DOS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS ENTRE OS PERÍODOS

Comparando-se os hormônios nos períodos escolhidos para os testes, observa-se que os meios tratados com 17β estradiol foram os que mais apresentaram maior influência sobre os comportamentos avaliados. (**Gráfico 24**). A inibição da velocidade média foi a mais influenciada por este hormônio no período de 7 dias de exposição.



Avaliação das inibições significativas comparando os hormônios e os tempos para os testes. Nas coordenadas, tem-se a porcentagem de inibição dos parâmetros. Nota-se uma influência mais acentuada nas culturas expostas ao 17 β – estradiol.

Gráfico 24: Avaliação das inibições significativas comparando os hormônios e os tempos escolhidos para os testes. Nas coordenadas, tem-se a porcentagem de inibição dos parâmetros. Nota-se uma influência mais acentuada nas culturas expostas ao 17 β estradiol.

8. CONCLUSÕES

Pelos resultados encontrados, percebe-se que as algas apresentam alguma sensibilidade na presença dos hormônios 17 α etinilestradiol e 17 β estradiol, sendo algumas significativas e de certo interesse para o entendimento destes fenômenos, bem como a utilização destes eventos para biotestes futuros.

A literatura relata muitos estudos nos quais se empregam o uso de antioxidantes para avaliar o comportamento de *E. gracilis*; e outros trabalhos investigaram o potencial antioxidante dos hormônios estradióis, em especial o 17 β estradiol, e este trabalho possibilitou a junção das duas informações na busca de alterações que fossem de utilidade para o emprego da *E. gracilis* como micro-organismo em biotestes.

No que se refere ao que foi encontrado nos resultados, um dado que chamou a atenção foi o aumento significativo da dissipação NPQ em relação ao

controle e meio contendo solvente obtido na presença de 17 β estradiol. Tal condição implica que este hormônio apresenta um potencial antioxidante responsável por certa fotoproteção e que ainda contribui para a formação de outros antioxidantes carotenoides, como a zeaxantina. Tal condição seria interessante, não para a identificação de 17 β estradiol em rios e lagos, visto que pode existir uma variedade muito grande de compostos antioxidantes que levariam a este efeito, mas em se tratando de testes *in vitro*, envolvendo testes de remoção estrogênica.

Este parâmetro poderia ser de grande valia, pois se, inicialmente as algas apresentam tal comportamento, em processos químicos de remoção de estrógenos, os produtos formados não deveriam apresentar tal condição, indicando sucesso na remoção. Além disto, se os produtos formados fossem ecotoxicológicos, seria possível identificar tal condição pelo comportamento das algas. Isto traz uma vantagem aos processos atuais pelo fato de que tal identificação é feita com peixes, e estes testes demoram meses, e os testes feitos com micro-organismos geneticamente modificados não apresentam significância para o meio ambiente, pois nem sequer existem na natureza.

Quanto ao aumento da dissipação NPQ, testes seguintes sugerem a confirmação da hipótese da formação aumentada de zeaxantina; pois os testes envolvendo a extração de clorofila demonstraram um aumento significativo na formação de carotenoides, classe de composto na qual se inclui a zeaxantina. Estudos posteriores necessitam ser realizados para tal identificação, pois a confirmação destes implica no uso seguro deste marcador em biotestes envolvendo o 17 β estradiol. Este fenômeno não se apresentou de forma significativa no 17 α etinilestradiol e no meio contendo apenas solvente. Pelo contrário, a acetona

implicou uma diminuição tanto da clorofila como dos carotenoides, reforçando a ação deste hormônio no fenômeno envolvendo a fotoproteção por ação antioxidante.

Outros aspectos como eficiência fotossintética e dissipação qN não apresentaram alterações significativas que atendessem ao propósito do trabalho.

Quanto ao comportamento das algas frente à exposição dos hormônios, notou-se que alguns parâmetros, como velocidade e velocidade de subida à superfície, foram significativamente alterados, principalmente pelo 17 β estradiol, apontando mudanças comportamentais que não implicam toxicidade, pois mesmo sendo comportamentos importantes para a alga, como a subida à superfície, não se pode concluir que será tóxico ao longo do tempo, pois o organismo da alga pode se adaptar às condições e ter um comportamento adequado novamente. Os dados encontrados são importantes para o biomonitoramento, indicando algum risco. Os estudos demonstraram que estes hormônios, nas concentrações utilizadas, não apresentaram risco e toxicidade aguda para as algas.

Por fim, o potencial antioxidante do 17 β estradiol o credencia a estudos mais aprofundados quanto as suas influências sobre algas celulares, o que não foi evidenciado para o 17 α etinilestradiol. E as algas podem ser úteis em biotestes envolvendo estudos *in vitro* destes hormônios, mas não servem como bioindicadoras dos mesmos, pois a sua característica principal e que é sugestiva para as ações descritas — ação antioxidante — pertence a inúmeros outros compostos.

REFERÊNCIAS

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. [S.l.]. *Ciência e Saúde Coletiva* 12 (1). P. 61-72. **2007**

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

BELSHE, E. F., DURAKO, M. J. and BLUM, J. E. Photosynthetic rapid light curves (RLC) of *Thalassia testudinum* exhibit diurnal variation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 342, 253-268. **2007**.

BILA, D. M., MONTALVÃO, A. F., AZEVEDO, D. A., DEZOTTI, M. "Estrogenic Activity Removal of 17 β -Estradiol by Ozonation and Identification of by-Products", *Chemosphere*, v. 69, pp. 736-746, **2007**.

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. Bolhàr-Nordenkampf, C.R.C. Leegood, S.P. Long, eds.). Chapman & Hall, London, p.193-206, **1993**.

BUIKEMA, A. L.; VOSHELL, J. R. Toxicity studies using freshwater benthic macroinvertebrates. In: ROSENBERG, D. M.; RESH, V. H. (Eds.) *Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates*. Nova York: Chapman and Hall, 488p. p. 344-398. **1993**.

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

COLEMAN, H. M., ABDULLAH, M. I., EGGINS, B. R., PALMER, F. L. "Photocatalytic Degradation of 17 β -Oestradiol, Oestriol and 17 α -Ethinylloestradiol in Water Monitored Using Fluorescence Spectroscopy", *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 55, p. 23-30, **2005.**

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

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 Facilities", *The Science of the Total Environment*, v. 302, p. 199–209, **2003.**

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 de Doutorado, **2007.**

EKELUND, N.G.A; NILSSON, L. Effects of estrogenic substances on the movement of *Euglena Gracilis* Verh. Internat. Verein. Limnol. 2008, vol. 30, Part. 2, Stuttgart, April, **2008.**

ERZINGER, G.S.; DEL CIAMPO & HÄDER, D.P. EQUIPAMENTO E PROCESSO PARA ANÁLISE DE TOXICIDADE EM SISTEMAS AQUÁTICOS. Instituto nacional de propriedade industrial – inpi. Nº. 0000221105523696. **2011**.

FERREIRA, M. G. M. Remoção da atividade estrogênica de 17β -estradiol e de 17α -etinilestradiol pelos processos de ozonização e O_3/H_2O_2 . USP.Tese de Doutorado, **2008**.

FILHO, R. W. R; Santos, R. L; Vieira, E. M. Poluentes emergentes como desreguladores endócrinos. J. Braz. Soc. Ecotoxicol, vol.2, n3, 283-288, **2007**.

FUJITA, T.; JAMES C. HIDEO T. Effects of reactive oxygen species on α -tocopherol production in mitochondria and chloroplasts of *Euglena gracilis* J Appl Phycol 21:185–191 **2008**.

GENNARO, A.R. Remington. A Ciência e a Prática da Farmácia. 20^a. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, **2004**.

KACHADOURIAN, R; JOHNSON, C.A., MIN, E., SPASOJEVIC, I; ANDDAY, B Flavin dependent antioxidant properties of a new series of imidazolium substituted manganese (III) porphyrins. Biochem. Pharmacol. P.67, 77–85. **2004**.

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, 82 P. 670 – 678. **2011**

LICHTENTHALER H.K., WELLBURN A.R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem Soc Transact* 11:591–592. **1983**.

LIEHR, JG; ROY, D; ARI-ULUBELEN, A; BUI QD; WEISZ, J; STROBEL, HW. 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.* Apr; 35(5): 555-60. **2008**

MANIERO, M.G.; BILA, D.M.; DEZOTTI, M.; Degradation and estrogenic activity removal of 17 β - estradiol and 17 α -ethinylestradiol by ozonation and O_3/H_2O_2 . *Science of the Total Environment*, vol. 407, p. 105 –115, **2008**.

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

MATORIN, P.S. VENEDIKTOV. Modification of Fluorescence of Chlorophyll of Phelloderm in the period of Dormancy in Connection with Tolerance to Frost in Grape Plants, *Phyziol. rastenii* 36 (4), 802– 806. **1989**.

MATTOS, I L.; SHIRAISHI I, KARINA K. Peróxido de Hidrogênio: Importância e determinação. *Química Nova*, vol. 26 n3. São Paulo, **2003**.

MELO, S. A. S; *et al.* Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. *Química Nova*, vol.32 n.1. São Paulo, **2009**.

MUNNÉ-BOSCH, S., AND ALEGRE, L. The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21, 31–57. **2002**.

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.* 3, 121-131, **2008**.

OGBONNA, JC; ICHIGE, E; TANAKA, H. Interaction between photoautotrophic and heterotrophic metabolism in photoheterotrophic cultures of *Euglena Gracilis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 58:532–538, **2002**.

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

REIGOTA, M. *Meio Ambiente e Representação Social*. 7º Edição. São Paulo: Cortez, **2002**.

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

ROHÁČEK, K. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica*, v. 40, n. 01, p. 13-29, **2002**.

ROLLAND F, WINDERICKX J, THEVELEIN JM Glucose-sensing and-signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res* 2: 183. **2002**.

SILVA, Carla G. A. da; Collins, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. *Química Nova*, vol.34, n.4. São Paulo, **2011**.

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

STACEY A., MAOYUN T., M.T.RAVI S. Estradiol-17 β as an antioxidant: Some distinct features when compared with common fat-soluble antioxidants. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine. Volume 128, Issue 4, Page A1, October **1996**.

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. 82 (7), 1062-1071. **2011**

WARING, R. H., HARRIS, R. M. "Endocrine disrupters: 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, P. A. Ecotoxicologia. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações. 2. ed. São Carlos: RiMa, 486p. p 1-13. **2008**.