

MONICA RIBAS

**Desenvolvimento de um bioensaio para Dexametasona baseado no modelo da
membrana corioalantóica de embriões de galinha:
estudo em soluções aquosas diluídas**

São Paulo

2023

MONICA RIBAS

**Desenvolvimento de um bioensaio para Dexametasona baseado no modelo da
membrana corioalantóica de embriões de galinha:
estudo em soluções aquosas diluídas**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação de Mestrado Profissional Interunidades com Formação Interdisciplinar em Saúde para obter o título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Ligia Ferreira Gomes

São Paulo

2023

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Ribas, Monica.

Desenvolvimento de um bioensaio para Dexametasona baseado no modelo da membrana corioalantóica de embriões de galinha: estudo em soluções aquosas diluídas / Monica Ribas; orientadora Ligia Ferreira Gomes. -- São Paulo, 2023.

117 p. : fig., tab., graf. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado Profissional) -- Programa Mestrado Profissional Interunidades em Formação Interdisciplinar em Saúde. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Bioensaio. 2. Dexametasona. 3. Angiogênese. 4. Coeficiente de Murray. 5. Bioindicador. 6. Monitoramento ambiental. I. Gomes, Ligia Ferreira. II. Título.

Ribas M. Desenvolvimento de um bioensaio para Dexametasona baseado no modelo da membrana corioalantóica de embriões de galinha: estudo em soluções aquosas diluídas. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 08/05/2023

Banca Examinadora

Profa. Dra.Ligia Ferreira Gomes

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

Profa. Dra.Claudia Maria Bógus

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

Profa. Dra.Sonia Will

Instituição: IPEN-USP-Alchemy Inovação, Pesquisa e Desenvolvimento

Julgamento: Aprovada

Esta dissertação é dedicada à minha filha Natalia, companheira de vida, ideias e ideais, pelo seu apoio incondicional afetivo e técnico e sua paciência infinita...

E à minha família por toda colaboração neste trajeto.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Ligia Ferreira Gomes pela parceria no trabalho.

À Alveriane Felix pelo treinamento técnico no modelo CAM.

À Joyce dos Anjos Almeida, à Jennifer Adriane dos Santos e ao Antônio Carlos Bloise Jr. pelo auxílio técnico no laboratório.

Ao Leandro Tíclia de la Cruz pela disponibilização do programa CAMLigia e por sua dedicação em obter novos parâmetros necessários a análise das amostras.

À Sonia Castro, secretária do Mestrado Profissional Interunidades em Formação interdisciplinar em saúde.

À Dra. Ana Maria Cervato Mancuso por todas orientações neste trajeto.

Ao Dr. Adriano Mesquita Alencar por receber o trabalho do grupo com o bioensaio no Lab M2.

Ao Departamento de Física Geral, por acolher o grupo de pesquisa.

À Fisiotox por ceder espaço para a divulgação do trabalho.

À Dra. Maria Inês Zanoli Sato por compor minha banca de qualificação.

À Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), pela disponibilidade em ceder amostras.

À Carina Araki de Freitas, diretora da Vigilância de Saúde Oeste que possibilitou a finalização deste trabalho.

À Natalia Ribas Guerrero por me auxiliar na finalização técnica deste trabalho.

Ao Gabriel Ranieri Gomes Silva, pela disponibilização do programa que calcula os coeficientes de Murray.

Ao Hallyson Goes pelo seu auxílio com estadiamento de embriões

À Equipe da Divisão Regional Oeste de Vigilância Saúde.

Aos companheiros da minha turma do Mestrado, sempre dispostos a ajudar.

RESUMO

Ribas M. Desenvolvimento de um bioensaio para Dexametasona baseado no modelo da membrana corioalantóica de embriões de galinha: estudo em soluções aquosas diluídas [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2023. Versão corrigida.

Este trabalho consiste numa proposta de adaptação do modelo da membrana corioalantóica de embrião de galinha, uma plataforma robusta usada para avaliação de angiogênese, para a determinação da perturbação do crescimento da rede vascular causada por soluções aquosas diluídas de Dexametasona, que é um contaminante ambiental com atividade antiangiogênica. As concentrações testadas compatíveis com as encontradas em águas superficiais, foram de 0,8 ng/L, 8 ng/L, 20 ng/L e 80 ng/L. O desenho experimental considerou a solubilidade da substância em veículo hidroalcolico e a compatibilidade do modelo (100 µL /ovo). Em todos os grupos expostos à Dexametasona, foram observados efeitos gerais sobre a vasculatura, com mais intensidade e frequência após exposição às doses mais altas. Esses efeitos compreendem um grande número de anastomoses e vasos com ramificações triplas, vasos curvos, bifurcações próximas em vasos de calibre médio, produzindo percursos paralelos de vasos finos e perda da hierárquica típica de distribuição das ramificações. O bioensaio foi aplicado em condições em que a Dexametasona não modificou o peso e o tamanho dos embriões em desenvolvimento, em nenhum dos grupos. Houve atraso discreto no estadiamento segundo a escala de Hamburger e Hamilton entre os embriões expostos às menores concentrações testadas. O coeficiente de Murray mostrou-se promissor como um bioindicador do efeito dose-dependente sobre o desenvolvimento da rede vascular da membrana em concentrações de Dexametasona compatíveis com as existentes em águas superficiais do ambiente urbano e que são de interesse para análise ambiental. Os dados sugerem que a membrana corioalantóica de embrião de galinha pode ser aplicável para análise de Dexametasona em águas superficiais do ambiente urbano, sem a necessidade de concentração das amostras coletadas. Este desenvolvimento resultou no produto educacional que foi apresentado no ciclo de palestras da Fisiotox da Faculdade de Ciências Farmacêuticas para alunos de pós graduação com finalidade de educação permanente.

Palavras-chave: Bioensaio. Dexametasona. Membrana corioalantóica de galinha. Angiogênese. Coeficiente de Murray. Bioindicador. Monitoramento ambiental.

ABSTRACT

Ribas M. Development of a bioassay for Dexamethasone based on the chicken embryo chorioallantoic membrane model: study in dilute aqueous solutions [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2023. Versão Corrigida.

This work consists of a proposal to adapt the chicken embryo chorioallantoic membrane model, a robust platform used for the evaluation of angiogenesis, for the determination of disturbance in the growth of the vascular network caused by dilute aqueous solutions of Dexamethasone, which is an environmental contaminant with antiangiogenic activity. The tested concentrations, compatible with those found in surface waters, were 0.8 ng/L, 8 ng/L, 20 ng/L and 80 ng/L. The experimental design considered the solubility of the substance in a hydroalcoholic vehicle and the compatibility of the model (100 μ L/egg). In all groups exposed to Dexamethasone, general effects on the vasculature were observed, with more intensity and frequency after exposure to higher doses. These effects include a large number of anastomoses and vessels with triple branches, curved vessels, close bifurcations in medium-sized vessels, producing parallel courses of thin vessels and loss of the typical hierarchical distribution of branches. The bioassay was applied under conditions in which dexamethasone did not modify the weight and size of the developing embryos, in any of the groups. There was a slight delay in staging according to the Hamburger and Hamilton scale among embryos exposed to the lowest tested concentrations. Murray's coefficient has shown to be promising as a bioindicator of the dose-dependent effect on the development of the membrane vascular network at concentrations of dexamethasone compatible with those existing in surface waters of the urban environment and which are of interest for environmental analysis. The data suggest that the chicken embryo chorioallantoic membrane may be applicable for the analysis of dexamethasone in surface waters of the urban environment, without the need for concentration of the collected samples. This development resulted in the educational product that was presented in the cycle of lectures given by Fisiotox at the Faculty of Pharmaceutical Sciences for graduate students with the purpose of continuing education.

Keywords: Bioassay. Dexamethasone. Chicken chorioallantoic membrane. Angiogenesis. Murray's coefficient. Bioindicator. Environmental monitoring.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Glicocorticoides.....	30
Figura 4.1 - Metodologia da exposição	53
Figura 4.2 - Metodologia da coleta	55
Figura 5.1 - Processamento manual de imagens CAM para validação do método automático.....	67
Figura 5.2 - Região de interesse (ROI) de uma membrana escaneada	68
Figura 5.3 - Transformação da imagem da ROI em imagem binária pelo programa CAMLigia.....	68
Figura 5.4 - Identificação do grafo correspondente ao vaso ramificado pelo programa CAMLigia	69
Figura 5.5 - Identificação das forquilhas para o cálculo manual do coeficiente de Murray	69
Figura 5.6 - Identificação do vaso pai e dos vasos filhos nas forquilhas de Dexa 0,8 ng ROI 5.....	71
Figura 5.7 - Curva dose-resposta das concentrações de Dexametasona	71
Figura 5.8 - Procedimentos técnicos amostras biológicas.....	72
Figura 5.9 - Procedimento extração e escaneamento imagem CAM: Fluxograma e imagens.....	73
Figura 5.10 - Processo de validação da Imagem	74
Figura 5.11 - Fotos do estadiamento dos embriões segundo os parâmetros: bico, olho, patas e asas	75

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 2.1 - Artigos sobre contaminantes emergentes de fármacos publicadas entre 2008 e 2019, disponíveis nas bases Scifinder, Scielo e Lilacs.	41
Gráfico 5.1 - Efeito de Dexametasona sobre o peso do embrião	61
Gráfico 5.2 - Efeito de Dexametasona sobre o tamanho do embrião	62
Gráfico 5.3 - Efeito de Dexametasona sobre o desenvolvimento – estágio HH olhos	63
Gráfico 5.4 - Efeito de Dexametasona sobre o desenvolvimento – estágio HH patas	63
Gráfico 5.5 - Efeito de Dexametasona sobre o desenvolvimento – estágio HH bico	64
Gráfico 5.6 - Efeito de Dexametasona sobre o desenvolvimento – estágio HH asas	64
Gráfico 5.7 - Parâmetro de índice de ramificação executados pelo programa CAMLigia.....	66
Gráfico 5.8 - Histograma de frequência dos padrões binários de contraste local	66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	MOTIVAÇÃO/JUSTIFICATIVA	41
3	OBJETIVOS	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
5	RESULTADOS	59
6	DISCUSSÃO	77
7	CONCLUSÕES	81
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	83
	REFERÊNCIAS	85
	ANEXOS.....	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contaminantes emergentes

Contaminantes emergentes são micropoluentes de origem química que têm sido detectados nas águas de superfície, numa mistura complexa, em concentrações da ordem de micro a nanogramas por litro.

Nesta denominação estão incluídas diversas classes de substâncias, tais como: fármacos; compostos usados em produtos de higiene pessoal (como protetores solares); hormônios, alquilfenóis e seus derivados; drogas ilícitas; sucralose e outros adoçantes artificiais; pesticidas; subprodutos de transformação físico-química provenientes de processos de desinfecção de águas (DBP, do inglês *Disinfection Byproducts*); retardantes de chama bromados; compostos perfluorados; siloxanos; benzotriazóis; ácidos naftênicos; percloratos; dioxinas; nanomateriais; líquidos iônicos e microplásticos. Além desses, alguns microrganismos e toxinas de algas também são considerados contaminantes emergentes (1).

A crescente preocupação com os contaminantes emergentes acompanha a evolução da urbanização e dos modos de vida das populações humanas. No processo de constituição de grandes centros urbanos, a necessidade de uma segurança alimentar e o desenvolvimento das indústrias químicas e farmacêuticas acabaram gerando resíduos diversos a serem descartados no meio ambiente.

1.2 Interferentes endócrinos

Dentre os contaminantes emergentes, alguns compostos são ainda classificados pelos seus potenciais ou capacidades de alterar as funções do sistema endócrino e, conseqüentemente, causar efeitos adversos a um organismo saudável ou a seus descendentes. Tais compostos receberam inicialmente o nome de disruptores endócrinos, nomenclatura derivada do termo correspondente em inglês

endocrine disruptors, mas hoje são conhecidos na literatura como desorganizadores endócrinos, desreguladores endócrinos ou como interferentes endócrinos, sendo esta última a nomenclatura adotada para este trabalho.(2)

São denominados interferentes endócrinos, segundo a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA), qualquer “agente exógeno capaz de interferir na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação dos hormônios naturais no corpo que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento” (2).

A hipótese atual sobre a ação de interferentes endócrinos sobre a saúde humana teve sua origem em relatos científicos importantes que documentaram inequivocamente a correlação entre exposição química e adoecimento humano, tais como o aparecimento de câncer no sistema reprodutivo de filhas de mulheres que usaram dietilestilbestrol (DES) na gravidez, entre 1940 e 1970 (3), e um estudo na Dinamarca que relata o declínio da qualidade do sêmen de homens durante aproximadamente 50 anos, entre os anos de 1938 e 1990 (4).

O Comitê Científico da Toxicidade, Ecotoxicidade e Ambiente, criado pela Comunidades Europeia para estudos desta natureza, concluiu que há relação entre alguns interferentes endócrinos e alterações na saúde humana – como o câncer de testículo, de mama e de próstata, o declínio das taxas de espermatozoides, deformidades dos órgãos reprodutivos e disfunção da tiroide –, mas ainda existem dúvidas se a exposição crônica a matrizes aquáticas contendo essas substâncias é efetiva na produção desses efeitos. Estudos mais recentes sugerem também: antecipação da menarca, aumento da obesidade e desenvolvimento precoce do cérebro (1). Sabe-se, porém, que nosso sistema endócrino funciona com transmissores na ordem de micro a pico gramas, o que sugere que esses contaminantes emergentes possam ser ativos nas concentrações encontradas, o que os torna motivo de preocupação (5).

1.3 Políticas públicas e agências reguladoras

O Estado desenvolve uma série de programas que visam garantir os direitos e o bem-estar da população, no formato de políticas públicas. Agências reguladoras estabelecem normas, ações e fiscalizam sua execução.

A seguir, as normas colocadas em tabela em ordem cronológica para o estado de São Paulo (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 - Normas do estado de São Paulo

Norma legal	Objeto da Norma	Relação com resíduo de medicamento
CO RDC 306/2004 ANVISA Revogada RDC 222/2018 com a mesma finalidade	Dispõe sobre o regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Esta norma aplica-se a todos os serviços de saúde, como distribuidores de medicamentos, farmácias, hospitais e drogarias, dentre outros.	Destaca o gerenciamento de resíduos como um conjunto de procedimentos de gestão, planejados e implementados a partir de bases científicas e técnicas, normativas e legais, com o objetivo de minimizar a geração de resíduos e proporcionar ao que foi gerado um encaminhamento
Resolução nº 358 /2005 CONAMA	Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências.	Semelhante à Resolução 306/2004 da Anvisa, porém ressalta os princípios da não geração de resíduos e da minimização da geração; aponta e descreve ações relativas a seu manejo: geração, segregação, acondicionamento, coleta, armazenamento, por exemplo

CVS 21/2008	<p>Aprovar norma Técnica sobre Gerenciamento de Resíduos Perigosos de Medicamentos em</p> <p>Serviços de Saúde</p>	<p>Estabelecer normas de gerenciamento de resíduos de saúde para o estado de São Paulo</p> <p>Visando a segurança para a saúde pública e meio ambiente</p>
RDC nº 44 /2009 ANVISA	<p>Dispõe sobre Boas Práticas Farmacêuticas para o controle sanitário do funcionamento, da dispensação e da comercialização de produtos e da prestação de serviços farmacêuticos em farmácias e drogarias e dá outras providências</p>	<p>Para obtenção do certificado de boas práticas, as farmácias e drogarias devem manter programa de gerenciamento de resíduos como item imprescindível; além disso, a sua ausência constitui infração sanitária</p>
Lei 12305 /2010	<p>Esta Lei institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos, dispondo sobre seus princípios, objetivos e instrumentos, bem como sobre as diretrizes relativas à gestão integrada e ao gerenciamento de resíduos sólidos, incluídos os perigosos, às responsabilidades dos geradores e do poder público e aos instrumentos econômicos aplicáveis.</p>	<p>Os medicamentos foram incluídos como resíduos químicos perigosos Classe B e sua destinação final adequada prevista para aterros sanitários desta classe.</p> <p>Também foi instituída a logística reversa mas sem uma clareza dos papéis dos atores envolvidos</p>

<p>Resolução RDC nº 17/2010</p> <p>ANVISA</p>	<p>Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de medicamentos.</p>	<p>Para obtenção do certificado de boas práticas, os laboratórios farmacêuticos devem manter programa de gerenciamento de resíduos como item imprescindível; além disso, a sua ausência constitui infração sanitária.</p>
<p>Decreto 10388/2020</p> <p>Planalto</p>	<p>Regulamenta o § 1º do caput do art. 33 da Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010, e institui o sistema de logística reversa de medicamentos domiciliares vencidos ou em desuso, de uso humano, industrializados e manipulados, e de suas embalagens após o descarte pelos consumidores</p>	<p>Definição dos papéis dos atores envolvidos no ciclo de vida do medicamento</p>

Fonte: Falqueto e Kligerman (6).

Outras Resoluções da ANVISA auxiliaram na parte conceitual de Redução de Resíduos:

RDC 80/2006 ANVISA

Dispõe sobre o fracionamento de medicamentos, favorecendo a diminuição de geração de resíduos de medicamentos no domicílio, além da minimização dos impactos ambientais, forneceu um melhor aproveitamento dos recursos dos usuários

RDC 96/2008 ANVISA

Dispõe sobre a propaganda de medicamentos na mídia. Procura coibir a automedicação, um dos motivos apontados como uso não racional de medicamentos, além de evitar excesso de resíduos de fármacos em domicílio.

1.4 Resíduos farmacêuticos na contaminação química evitável e não evitável

Segundo Paradys-Tanguay, os resíduos farmacêuticos são reconhecidos como a maior fonte de poluição química para as águas residuais urbanas (7).

Esta fonte de poluição tende a se ampliar em função dos resíduos de medicamentos serem constantemente despejados no ambiente.

A contaminação por resíduos químico-farmacêuticos nem sempre pode ser considerada evitável, o que implica que as políticas públicas de prevenção tenham alcance limitado na eliminação dos efeitos desse tipo de poluição. Contaminações evitáveis constituem as contaminações industriais, hospitalares (ou equiparadas) e da rede de comércio varejista farmacêutico que poderiam ser mitigadas por meio de legislações ambientais coerentes, fiscalização contínua e descarte adequado de medicamentos através de uma educação ambiental dirigida à população em geral e aos vários profissionais envolvidos em todas as etapas do ciclo de vida dos medicamentos (8).

As contaminações consideradas inevitáveis, que requerem ações de vigilância sanitária e remediação, são causadas pelo despejo de fármacos em efluentes domésticos derivadas da excreção de produtos farmacêuticos e seus metabólitos, no caso de produtos de uso interno ou pela remoção durante o banho, no caso de produtos de uso externo (8,9).

1.5 Manejo e eliminação de contaminantes emergentes de esgoto sanitário

Existem muitos processos tecnológicos de tratamento de esgoto sanitário. Nas estações de tratamento de efluentes, ocorrem o pré-tratamento, por gradeamento e desarenação e o tratamento propriamente dito. As etapas de tratamento classificadas como primária, secundária e terciária abrangem combinações de processos distintos, de natureza física, química e biológica, com eficiências variadas e que podem ajustar os esgotos aos padrões previstos pela legislação ambiental brasileira (9). O tratamento primário é composto por procedimentos de floculação e

sedimentação; o secundário, por processos biológicos de oxidação e o terciário da remoção de contaminantes específicos, dirigido para a obtenção de um produto de alta qualidade,

Tecnologias como Processos Oxidativos Eletroquímicos Avançados (POEA), carvão ativado e sistemas de membrana têm sido foco de estudos na remoção dos micropoluentes. A técnica envolvendo carvão ativado foi destaque num estudo realizado em 2017 devido a seus eficientes resultados reportados, podendo ainda ter seus custos significativamente reduzidos com a possibilidade de variação da matéria prima adsortiva (9).

Outros processos para a eliminação de contaminantes emergentes de fármacos foram investigados em laboratório e considerados promissores, estabelecidos a partir de uma abordagem dirigida para o tipo de substância contaminante esperada. No Brasil, Maykel Douglas Marchetti, pesquisador do Instituto de Química da USP-São Carlos, após realizar levantamento sobre os fármacos mais prescritos e consumidos no país, determinou as quatro substâncias químicas mais prováveis de serem encontradas na água. São elas: paracetamol (analgésico), cetoprofeno (anti-inflamatório), diclofenaco (anti-inflamatório) e ácido salicílico (utilizado no tratamento da acne). Com essas informações, Marchetti desenvolveu um método analítico capaz de detectar e quantificar, simultaneamente, todos esses quatro fármacos em água, para em seguida aplicar uma técnica para degradá-los, que funciona através de uma reação química envolvendo peróxido de hidrogênio (água oxigenada), oxalato de ferro e luz (LED).

Segundo o pesquisador, em concentrações um milhão de vezes maiores que a encontrada nas águas, a eliminação foi de 95% (10) o que não garante uma transposição para uma escala real.

Apesar de considerada de custo baixo, a transposição dessas tecnologias para largas escalas é ainda um obstáculo a ser superado frente a recursos escassos, como os que se associam a contextos sociais vulneráveis, inclusive de países em desenvolvimento. Além disso, a prova de conceito das tecnologias necessita ser realizada em condições de campo, em que a faixa de concentrações a ser abordada é mais baixa e para a qual existem dificuldades analíticas.

Vale a pena mencionar que países desenvolvidos com escassez hídrica vivem uma realidade diferente. Por exemplo, a Suécia sofria com a demanda de água ocasionada pelo turismo nos meses de verão. Em 12 de julho de 2019, foi inaugurada em Mörbylånga, na ilha sueca de Öland, uma estação de produção de água doce a partir de água salobra e águas residuais industriais tratadas, projetada para uma capacidade de 500 a 4 mil m³/d. Trata-se de um tratamento terciário acoplado ao tradicional, utilizando tecnologias de ultrafiltração e osmose reversa. Nesta estação, a água bruta passa por um estágio de pré-tratamento, seguido por um estágio de ultrafiltração e osmose reversa. O permeado de osmose reversa é desinfetado e remineralizado de acordo com o regulamento sueco e as normas internacionais de água potável (11).

No Brasil, há alguns obstáculos relevantes para se implementar a gestão de contaminantes emergentes e seus resíduos, bem como o tratamento de água visando à retirada desses micropoluentes. Um deles é o fato de apenas dois terços da população possuírem saneamento básico, segundo a Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílio (PNAD) de 2015 (12) – e parte dele consistir em fossa séptica ligada a planta de esgoto. Além disso, a logística reversa proposta pela Política Nacional de Resíduos Sólidos gera ainda inúmeros fóruns de discussão (13) e, mesmo com o decreto federal Nº 10.936/2022 procurando dar força ao movimento, continua ainda em fase de implementação.

Em todo o mundo, enfrentamos o desafio de obter ferramentas capazes de mensurar concentrações de substâncias de interesse abaixo das quais são observados efeitos nocivos provocados pela sua presença, como contaminantes, no ambiente. Ao propor um critério de gestão de qualidade da água para a preservação da vida aquática, por exemplo, são necessários métodos analíticos que possuam detectabilidade suficiente para quantificar concentrações de contaminantes menores que os PNEC (do inglês, *Predicted No-Effect Concentration*) que indica a máxima concentração a qual um contaminante pode estar presente na água sem que se espere que ocorram efeitos crônicos na biota. Para o 17 α -etinilestradiol, que é um dos estrógenos sintéticos mais potentes amplamente usados nas pílulas anticoncepcionais, o PNEC calculado foi de 0,35 ng L⁻¹ para águas superficiais, sendo esta uma detectabilidade muito difícil de atingir, o que inviabiliza um

monitoramento efetivo e, conseqüentemente, a inserção da gestão deste contaminante em qualquer regulamentação (1).

Reduzir fontes evitáveis também pode auxiliar na busca pela diminuição da poluição química, pois o custo do tratamento terciário é proporcional à quantidade de micropoluentes encontrados na água. Iniciativas mundiais têm procurado contribuir para a redução de compostos a partir das fontes evitáveis, principalmente no que diz respeito aos fármacos interferentes endócrinos. Estas iniciativas passam por consumo consciente, descarte racional, educação ambiental e políticas públicas (14).

Identificar, quantificar, eventualmente extrair e, até mesmo, avaliar a toxicidade de contaminantes, isoladamente ou em misturas, representam um grande desafio para os cientistas que se adiantaram a dimensionar o problema da contaminação química da água. Essa questão, pela sua importância para a manutenção e preservação da vida, já está presente no objetivo de desenvolvimento sustentável número 6 da ONU da agenda 2030, instituído pela cúpula global de 2015 e referendado por 193 países.

1.6 Gestão de resíduos farmacêuticos em ambientes aquáticos sem salinidade (dulcícolas)

Além de representarem a principal fonte de contaminação química da água residuais e de associarem-se aos centros urbanos, os resíduos farmacêuticos distribuem-se no ambiente segundo um espectro de diferentes solubilidades e afinidades químicas e resistem de forma desigual aos recursos utilizados para a descontaminação geral de matrizes dulcícolas, o que evidencia a importância de seu monitoramento.

Se, por um lado, estruturas e características físico-químicas diversas dificultam sua extração por procedimentos simples, também é verdade que a presença de substâncias bioativas em águas superficiais pode produzir efeitos indesejados. Muitos antibióticos foram detectados nos influentes e efluentes das ETARs (Estação de Tratamento De Águas Residuais) em concentrações próximas

ou superiores às concentrações previstas sem efeito (PNECs) para seleção de resistência (15, 16). Entre as substâncias persistentes no ambiente, a carbamazepina e o sulfametoxazol acabam por se concentrar no lodo tratado, enquanto os anti-inflamatórios e analgésicos, os mais encontrados nas águas de superfície, permanecem solúveis nessa matriz aquática (17).

Contaminantes emergentes derivados de fármacos presentes no meio ambiente aquático podem ser transferidos para o ecossistema terrícola por insetos que habitam as margens de matrizes aquáticas e usam desses mananciais como forma de dessedentação (biovetores). Águas contaminadas por resíduos farmacêuticos de hidroxizine e fexofenadine produziram respostas biológicas alteradas em bio vetores, como estresse oxidativo, comprometimento do sistema imunológico e até alterações de comportamento, tornando-os menos reativos a predadores, confirmando a toxicidade dos contaminantes (18).

O uso de águas residuais e lodo como adubo na agricultura sem o adequado tratamento tem despertado interesse sobre uma possível contaminação. Estudos *in vitro* apontaram para uma significativa absorção de resíduos de fármacos, como triclosan (TCS), ácido hidroxicinâmico (HCA), tonalida (TON), ibuprofeno (IBF), naproxeno (NPX) e ácido clofíbrico (CFA), por alface (*Lactuca sativa* L.) e lírios (*Spathiphyllum spp.*) expostos a águas residuais onde estavam presentes (19).

Os hormônios femininos, excretados diariamente no esgoto, são interferentes endócrinos e causadores de efeitos ecológicos tóxicos como a efeminação de algumas espécies de peixes (20).

Novos contaminantes derivados de medicamentos, como betabloqueadores e metotrexato, começaram a surgir em águas onde antes não eram encontrados, revelando o impacto do uso crescente desses medicamentos. Como resultado das atividades constantes da indústria farmacêutica em busca de novos compostos para um arsenal terapêutico que corresponda às necessidades da população, é de se esperar que novos compostos sejam encontrados no futuro (5, 21).

Considerada a relevância destes resíduos e tendo em vista o aumento de custo que um tratamento terciário implicaria para a engenharia sanitária, a proposta de um monitoramento das concentrações destes compostos a que vem sendo submetida à população, com a identificação dos limiares de concentração (gatilhos)

que determinam efeitos agudos e efeitos de longo prazo tem se revelado uma ferramenta útil para gestores na tomada de decisão de ações ambientais.

1.7 Hormônios glicocorticoides presentes em águas superficiais de consumo

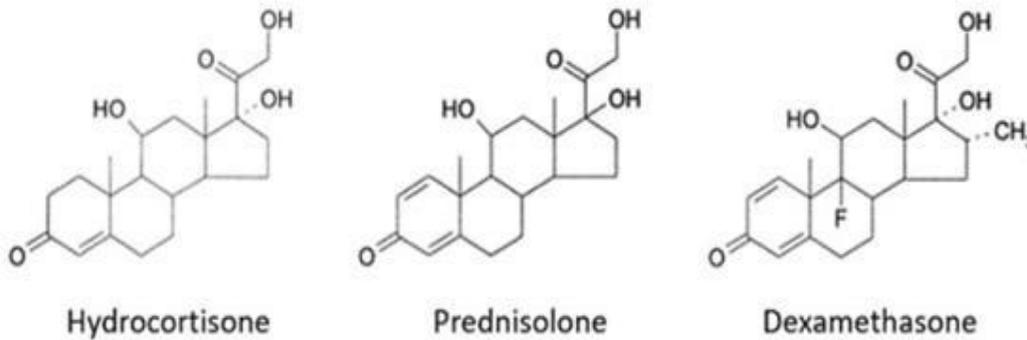
A substância alvo deste trabalho, assim como outros hormônios interferentes endócrinos, pode ser encontrada em águas superficiais como contaminantes emergentes. A Dexametasona (9 α -fluoro-16 α -metilprednisolona) é um hormônio glicocorticoide sintético (GC) derivado do hormônio cortisol produzido naturalmente no nosso organismo ou de sua forma sintética (hidrocortisona) e é considerada um protótipo desse grupo de substâncias.

O cortisol é um hormônio produzido na zona fasciculada das glândulas adrenais que controla inúmeras funções do nosso organismo, desde o metabolismo de carboidratos no fígado, até a imunidade e as respostas inflamatórias, que fazem parte das nossas defesas. Sua produção é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e suas funções são regidas pelo receptor de glicocorticoide.

Esse receptor está distribuído por todos os tecidos do corpo, havendo, no entanto, heterogeneidade na sua sensibilidade aos diferentes hormônios glicocorticoides (GC) e nas respostas biológicas induzidas por eles. A amplitude das ações dos GC sobre a biologia celular e seus efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores fez deles instrumentos fundamentais no tratamento de diversas alterações inflamatórias agudas e crônicas, doenças autoimunes e hematológicas (22).

A Dexametasona, cuja fórmula estrutural está representada na figura 1-1, foi sintetizada pela primeira vez em 1957 e a adição de um átomo de flúor na posição 9 α tornou o composto mais potente como glicocorticoide (Figura 1.1).

Figura 1-1 - Glicocorticoides



Fonte: Oxford Brazil.

A dexametasona se apresenta como um pó cristalino, branco ou quase branco, inodoro, ligeiramente amargo e estável ao ar. É praticamente insolúvel em água, solúvel em 42 partes de álcool e 165 partes de clorofórmio (massa/massa), muito pouco solúvel em acetona, dioxano e metanol e ligeiramente solúvel em éter.

Em relação às condições de conservação: Deve ser armazenada em recipientes fechados hermeticamente e protegida da luz (23).

A Dexametasona relaciona-se estruturalmente com os hormônios estrogênicos e androgênicos, que também são contaminantes emergentes e interferentes endócrinos importantes e sobre os quais existe um grande volume de pesquisas. Diferente do que ocorre com os hormônios estrogênicos e androgênicos, os métodos químico-analíticos disponíveis não têm a sensibilidade adequada para avaliar riscos toxicológicos dos compostos com atividade glicocorticoide (24, 25).

Os GC sintéticos, usados como medicamentos (Prednisolona, Fluticasona, Budesonida e Dexametasona, p. ex.), são resultantes de modificações feitas na estrutura do cortisol (hidrocortisona) com o intuito de amplificar os efeitos anti-inflamatórios ou de reduzir os efeitos sobre a regulação da absorção e eliminação de sais minerais, potencializar a deposição tópica e o metabolismo hepático (26). Suas funções imunorregulatórias resultam tanto do efeito sobre o DNA, suprimindo a produção de proteínas pró-inflamatórias e estimulando a formação de proteínas anti-

inflamatórias (efeito genômico), como de efeitos sobre outras estruturas celulares (efeito não-genômico).

Podem ser administrados pelas vias oral (VO), intramuscular (IM), intravenosa (IV), intra-articular (IA) e tópica (cutânea, inalatória ou como colírio). A lipofilicidade que caracteriza os GC favorece sua absorção rápida após a administração tópica e permite que passem rapidamente pela membrana celular e entrem no citoplasma, onde se ligam a receptores específicos que os levarão ao núcleo celular, onde exercerão seus efeitos junto ao DNA. Os GC inalatórios têm afinidade elevada pelo receptor, o que promove sua retenção nas vias aéreas. Por serem rapidamente metabolizados após sua absorção no trato gastrointestinal, os CG têm perfil de segurança adequado também para o uso em formulações orais (27).

Sua potência relativa depende da sua afinidade pelo receptor e de fatores intrínsecos. De acordo com a duração da sua ação, quando administrados pelas VO, IM, IV e IA, são classificados como de: ação curta: suprimem o ACTH por 8 a 12 horas (Cortisona e Hidrocortisona); ação média: suprimem o ACTH por 12 a 36 horas (Prednisona, Prednisolona, Metilprednisolona e Triancinolona) e ação prolongada: suprimem o ACTH por 36 a 72 horas (Dexametasona e betametasona) (28).

Os GC atuam no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas estimulando a gliconeogênese, aumentando a produção de glicogênio e também a sensibilidade dos tecidos à insulina. Ativam a lipólise e promovem a redistribuição de gordura. Também atuam sobre o sistema imune, inibindo a produção de citocinas que ativam o sistema imunitário, e diminuindo a expansão das células T e B. Seus efeitos anti-inflamatórios advêm do bloqueio ou retardo de etapas do processo inflamatório (22).

A Dexametasona foi um dos recursos terapêuticos considerados efetivos no tratamento dos casos graves de COVID-19.

A supressão imunológica causada pela Dexametasona através da ativação da histona deacetilase que se encontra alterada pela ação do SARS CoV-2, fundamentou a sua utilização clínica no tratamento do estado hiperinflamatório que tem características em comum com uma rara condição hematológica chamada

linfocitose hemofagocítica, a “tempestade de citocinas”, diante da qual a Dexametasona é eficaz (29).

Entretanto, todo o grupo de GC deve ser utilizado com cautela.

Dependendo da molécula de GC, da dose e do tempo de uso, há risco variável de efeitos indesejáveis, que podem ser graves, fazendo com que seu uso por prazos longos deva ser cercado de cuidados e monitorado. Dentre eles, perda de massa muscular, conjuntiva e óssea, hipertensão arterial, hipercolesterolemia, fragilidade capilar, estrias cutâneas e catarata. Além disso, se utilizados na infância, podem prejudicar o crescimento (30).

A Dexametasona possui uma ação antiangiogênica perturbadora do crescimento e regeneração da rede vascular de forma geral.

É capaz de interferir na formação de ossos longos, através de um mecanismo que está diretamente associado à angiogênese. Pesquisadores relataram um efeito modulador na proliferação osteoblástica e diferenciação durante a osteogênese embrionária. Neste estudo, embriões de galinha *in vivo* e culturas de células pré-osteoblásticas *in vitro* foram utilizados para investigar os efeitos de Dexametasona na formação de osteoblastos e diferenciação durante o desenvolvimento esquelético. Os autores demonstraram que a exposição a Dexametasona poderia encurtar os ossos longos de embriões de galinha de 17 dias *in vivo*, e também diminuir a expressão de genes relacionados à osteogênese. A seguir, estabeleceram que a exposição a Dexametasona inibiu a proliferação e viabilidade de pré-osteoblastos (Células MC3TC-E1). Verificaram também o importante papel da angiogênese na osteogênese por cultivo de falanges embrionárias isoladas em cultura em meio de Eagle modificado por Dulbecco ou em ovos embrionados de galinha. Por fim, estes achados sugeriram que a inibição do sinal Igf-1 causada pela exposição à Dexametasona exerce um impacto prejudicial na formação de osteoblastos e na angiogênese, o que conseqüentemente encurta os ossos longos durante a osteogênese (31)

Os GC têm potencial ação teratogênica embora sejam usados inclusive na prática de clínica médica para gestantes principalmente devido a alternativas limitadas para o controle da inflamação durante a gestação. Um estudo experimental analisou os efeitos de Dexametasona durante a embriogênese e obteve evidências

experimentais de interrupção do desenvolvimento da crista neural, o que por sua vez causou desenvolvimento defeituoso do osso craniano de embriões de galinha. O tratamento com 100 microlitros de uma solução 10^{-6} M retarda o crescimento do embrião, podendo plausivelmente levar à sua morte (32).

Como resultado do aumento do uso terapêutico da Dexametasona, espera-se também o aumento na contaminação ambiental não evitável por este composto, com potencial de acumulação no ambiente.

1.8 Iniciativas nacionais e internacionais de monitoramento de resíduos farmacêuticos

Como iniciativas mundiais de monitoramento de contaminantes emergentes de resíduos farmacêuticos em águas superficiais, citam-se estudos feitos por pesquisadores na Europa (33), na África (34), na Índia (35) e na China (36) que tiveram como objetivo verificar qualitativa e quantitativamente esses micropoluentes. No Brasil, esses poluentes foram identificados em água de consumo em Santos, litoral paulista (37).

Acompanhando as tendências internacionais de monitoramento de fármacos em águas superficiais, a CETESB, numa iniciativa pioneira na América Latina, iniciou em 2018, de forma experimental, o monitoramento de compostos farmacêuticos com atividades do tipo glicocorticoide, através de um bioensaio *in vitro* denominado CALUX. Os compostos com atividade glicocorticoide, de largo uso farmacoterapêutico, são classificados como interferentes endócrinos e contaminantes emergentes de preocupação. O protótipo escolhido para este grupo de substâncias foi a Dexametasona.

O cálculo das concentrações gatilho, ou do limiar de concentração que determina efeitos biológicos da atividade hormonal em amostras de água de consumo, foi estabelecido por Been e colaboradores (38) através de uma fórmula complexa, levando em conta a biodisponibilidade da substância no organismo, o peso médio de um indivíduo adulto (60 kg), a quantidade média de água ingerida (2 litros) e as propriedades do componente mais biodisponível dos compostos da

classe, com base em estudos clínicos (no caso dos glicocorticoides seria, por exemplo, a Prednisolona 85%, para estabelecer concentrações para monitoramento. Segundo esses autores, a concentração de Dexametasona considerada compatível com a ingestão diária aceitável (ADI) foi de 21 ng/L. Para concentrações abaixo do limiar, não é esperado um efeito biológico, enquanto que para concentrações acima do limiar, existe preocupação de indução de problemas para a saúde (39).

Entretanto, a diversidade da composição de amostras ambientais, e o possível efeito sinérgico entre contaminantes (40), dificultam a verificação de umnexo causal entre contaminantes emergentes de forma individual, agravando o cenário a ser enfrentado. A opção de se utilizar um bioensaio associado a métodos analíticos químicos qualitativos e quantitativos deve-se em grande parte à dificuldade em se analisar amostras ambientais.

Segundo o órgão ambiental do Estado de São Paulo, a complexidade e a composição desconhecida da mistura presente em amostras coletadas no ambiente dificultam o uso de métodos químicos para quantificar compostos de forma individual. Por isso, recentemente, o uso de bioensaios *in vitro* tem sido a ferramenta analítica mais utilizada para investigar a presença de contaminantes bioativos (41).

Os bioensaios utilizam de uma resposta biológica para mensurar alguns efeitos relacionados à presença dos contaminantes. Embora não permitam, de forma precisa, quantificar a presença dos contaminantes nas diferentes matrizes ambientais, como é esperado dos métodos analíticos convencionais, esses métodos podem ser utilizados para obter uma triagem da presença de contaminantes bioativos e avaliar de forma menos seletiva, e geralmente mais barata, o estado de contaminação.

1.9 Bioensaios *in vitro*

Os bioensaios *in vitro* utilizam culturas celulares, são bastante específicos e vêm se mostrando uma ferramenta analítica bastante sensível, mas não seletiva. Podem ser usados para complementar a interpretação dos dados químicos obtidos

em estudos de ocorrência, como análise preliminar de uma avaliação de risco, identificação de cenários mais críticos de contaminação, entre outros.

Esses bioensaios podem empregar diferentes mecanismos de detecção, incluindo interações antígeno-anticorpo como os bioensaios YES (do inglês, *Yeast Estrogen Screen*), BLYES (do inglês, *BioLuminesce Yeast Estrogen Screening*) e CALUX (do inglês, *Chemical Activated Luciferase Gene Expression*), proliferação de células como o LBA (do inglês, *Ligand Binding Assay* e indução de luciferase (termo genérico empregado para diferentes enzimas oxidativas que produzem bioluminescência durante a reação enzimática

Uma triagem induzível por estrogênio foi desenvolvida em levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e constitui os fundamentos do ensaio *Yeast Estrogen screen* (YES) A sequência de DNA do receptor de estrogênio humano (hER) foi integrada ao genoma da levedura, associada a plasmídeos de expressão portadores de sequências responsivas ao estrogênio (ERE) controlando a expressão do gene repórter *lacZ* (codificando a enzima β -galactosidase). Assim, na presença de estrogênios, a β -galactosidase é sintetizada e secretada no meio, onde causa uma mudança de cor de amarelo para vermelho. Esta cepa recombinante foi usada para determinar se os representantes das principais classes de surfactantes e alguns de seus principais produtos de degradação possuem atividade estrogênica. Os resultados foram comparados aos efeitos do principal estrogênio natural 17 β -estradiol (42).

O YES possui como vantagens o baixo limite de detecção, que é da ordem de 2 ng.L⁻¹ para o 17 β -estradiol (E2) ; a possibilidade de analisar elevada quantidade de amostras em ampla faixa de concentrações, uma vez que é realizado em microplacas de 96 poços; a visualização do resultado a olho nu devido a mudança na coloração do meio de amarelo para vermelho após 72 horas; alta especificidade, reprodutibilidade e rapidez do ensaio; e além disso, o ensaio apresenta efeito sinérgico, ou seja, apresenta o resultado de atividade estrogênica considerando todos os compostos que a causam, assim como ocorre no ambiente (43).

Sua desvantagem está relacionada a possibilidade do aparecimento de resultados falso positivos devido a possíveis contaminações, à formação de subprodutos causada pela degradação do composto cromogênico que elevam a atividade estrogênica e à alta sensibilidade da levedura utilizada no teste (42).

Um estudo feito para avaliar o efeito da cloração (processo mais difundido de desinfecção no Brasil) sobre a remoção de 17β estradiol (E2), um dos hormônios mais ativos de atividade estrogênica, utilizando o bioensaio YES, verificou que apesar das dificuldades enfrentadas na implementação e realização do ensaio, a cloração teve um efeito positivo na remoção da atividade estrogênica. Isto sugere a possibilidade da utilização do bioensaio em matrizes aquáticas para o monitoramento e acompanhamento do processo usual de tratamento sanitário (44).

Dias e colaboradores (45) avaliaram a atividade estrogênica dos rios Paraíba do Sul e Guandu, no Estado do Rio de Janeiro, usando YES como bioensaio, e reportaram a preocupação com o potencial estrogênico superior a 1 ng L^{-1} em vários pontos ao longo dos rios.

O bioensaio BLYES consiste de um gene repórter bioluminescente bacteriano induzível por estrogênio inserido em *Saccharomyces cerevisiae* para aplicações em detecção química e avaliação ambiental da atividade interferente endócrina.

Em comparação ao ensaio YES, a bioluminescência do ensaio BLYES foi observada em apenas 1 hora e atingiu seu máximo em 6 horas enquanto o ensaio YES exigiu um mínimo de 3 dias para obter os resultados embora em termos de sensibilidade sejam semelhantes. A cepa BLYES preenche o nicho para triagem rápida e de alto rendimento de compostos estrogênicos e tem a capacidade de ser usada para monitoramento remoto, quase em tempo real, de substâncias químicas desreguladoras de estrogênio no ambiente (46).

O limite de detecção do ensaio BLYES em atividade estrogênica de 17β estradiol foi $0,1 \text{ ng}$ (47).

Com o intuito de rastrear a atividade hormonal em amostras de água, foram elaborados os bioensaios *in vitro* CALUX que se mostraram altamente sensíveis para a detecção de atividades estrogênicas ($ER\alpha$), androgênicas (AR), progestagênicas (PR) e glicocorticoides (GR).

Eles se baseiam na bioluminescência produzida pela ligação da substância alvo a uma cultura de células geneticamente modificadas acopladas a uma enzima luciferase.

Num artigo dos criadores do método são apresentados valores de gatilho para os bioensaios $ER\alpha$, AR, PR e GR CALUX de atividades hormonais agonísticas

na água (potável), é definido um nível acima do qual o risco à saúde humana não pode ser dispensado. Os valores gatilho resultam de um cálculo complexo que leva em conta: valores de ingestão diária aceitável ou tolerável (ADI/TDI) de compostos específicos, fatores farmacocinéticos que definem sua biodisponibilidade, estimativas da biodisponibilidade de compostos desconhecidos com atividade hormonal equivalente, potências endócrinas relativas, e fatores fisiológicos e de alocação de água potável. Como resultado foram estabelecidos valores de gatilho de 3,8 ng para o 17 β -estradiol (E2)-equivalentes (eq)/L, 11 ng diidrotestosterona (DHT)-eq/L, 21 ng Dexametasona (DEX)-eq/L e 333 ng Org 2058-eq/L, para um monitoramento de água de consumo humano (39).

Os ensaios do tipo LBA (do inglês, *Ligand Binding Assay*) são os que avaliam as interações receptor-ligante, as quais exercem papel crucial nos sistemas biológicos, e sua medição constitui uma parte importante do desenvolvimento farmacêutico moderno.

Estão disponíveis vários formatos de ensaio que podem ser usados para rastrear e quantificar os ligantes do receptor, são empregadas tecnologias de ensaios radioativos e não radioativos. Embora os ensaios de radiorreceptores sejam rápidos, fáceis de usar e reprodutíveis, sua principal desvantagem é que eles são perigosos para a saúde humana, produzem resíduos radioativos, requerem condições laboratoriais especiais e, portanto, são bastante caros em larga escala. Isso levou ao desenvolvimento de ensaios não radioativos baseados em métodos ópticos como polarização de fluorescência, transferência de energia de ressonância de fluorescência ou ressonância de plasmon de superfície (48).

Outra aplicação de interesse tem sido medir atividades hormonais em matrizes aquáticas e avaliar a eficiência da remoção destes interferentes endócrinos em águas residuais (49).

Ensaio *in vitro* realizados em águas holandesas utilizando o bioensaio CALUX com genes repórteres foram capazes de identificar atividades androgênica, antiandrogênica, estrogênica, glicocorticoide e progestogênica de 25 compostos esteroidais mais vendidos em farmácia. As atividades androgênicas e estrogênicas foram quase completamente removidas durante o tratamento sanitário tradicional, a atividade antiandrogênica só foi encontrada em águas residuais tratadas, mas as atividades glicocorticoides e progestagênicas persistiram durante todo o tratamento.

Tais evidências corroboram a preocupação sobre a presença desses compostos no meio ambiente (38).

Além dos testes *in vitro*, outros testes surgiram utilizando organismos vivos para avaliar um efeito à uma substância ao qual foram expostos por um período conhecido de tempo fornecendo informações adicionais sobre os efeitos estrogênicos, androgênicos, de sinergismo ou influências antiestrogênicas relacionadas à presença de inúmeros contaminantes em uma amostra complexa.

1.10 Bioensaios *in vivo*

Os bioensaios *in vivo* empregam testes de toxicidade em organismos vivos. Os métodos padronizados podem utilizar uma população de organismos cultivados em laboratório, ou organismos que sejam representativos de um ambiente, bem como partes de um organismo, como culturas de células ou DNA, para avaliar um efeito detectável após a exposição do organismo a concentrações/doses conhecidas dos contaminantes. Algumas espécies aquáticas são frequentemente usadas como bioindicadoras em testes de toxicidade. Os efeitos observados (ou *endpoints*) podem ser morte, imobilidade, inibição da respiração ou do crescimento, interferência na reprodução, deformidade, genotoxicidade, mutagenicidade, indução de tumores, interferência endócrina etc.

Os interferentes endócrinos, podem ser avaliados pelos seus efeitos sobre o metabolismo. No Brasil, Sanchez confirmou a indução de vitelogenina por E2 (17 Beta estradiol) e EE2 (17 Alfa etinilestradiol) em peixes machos (*Rhamdia quelen*) nativos da região do Paraná (50).

O peixe-zebra é um modelo popular para toxicologia aquática e avaliação de risco ambiental. A expressão relativa de onze genes responsivos a glicocorticoides em larvas de peixe-zebra e fígado de peixe-zebra macho adulto expostos a três glicocorticoides representativos (Dexametasona, Prednisolona e Triancinolona) com vitroatividade glicocorticoide equivalente a 478 pM Dexametasona (DEX-EQ) e positiva para concentração- traço (0,2 ng/L ou menos) dos glicocorticóides alvo e possivelmente outros compostos ativos de glicocorticoide. O teste demonstrou

sensibilidade em concentrações originais e até mesmo diluída à metade e os pesquisadores sugeriram que ele pode ser complementar a testes *in vitro* e outros arsenais analíticos para auxiliar no monitoramento ambiental (51).

Bactérias luminescentes (*Vibrio fischeri*) foram utilizadas em testes ecotoxicológicos, avaliando-se as toxicidades de soluções aquosas das três formas químicas de Dexametasona (base, acetato e fosfato), das soluções pós-testes de biodegradação e de soluções pós-tratamento por eletrocoagulação (EC) e/ou fotocatalise (FC) (52),

A redução da bioluminescência é sinal positivo de toxicidade. Foram utilizados processos avançados de oxidação (EC e FC), isolados ou em combinação, para estudar a degradação química e/ou remoção adsorptiva de Dexametasona de soluções aquosas e de amostras de efluente hospitalar.

Os estudos de pronta-degradação e biodegradação, em solução aquosa, demonstraram que as formas químicas estudadas do anti-inflamatório Dexametasona não são biodegradáveis no ambiente. Considerando-se os valores PEC (*Predicted Environmental Concentration*) calculados para a concentração de Dexametasona no efluente hospitalar estudado pelo autor, pode-se afirmar que estes excedem o valor limite tolerável (OECD) para a emissão de efluentes para ambientes aquáticos (10 ng L^{-1}), sendo necessário estudo complementar de avaliação do risco ambiental.

O autor sugeriu que apesar da Dexametasona não apresentar toxicidade aguda ou crônica, não é biodegradável, e deve, portanto, sofrer remoção do efluente hospitalar antes de ser lançada ao ambiente aquático (52).

O teste com *Vibrio Fischeri* foi relatado por pesquisadores como o mais sensível em uma ampla gama de produtos químicos em comparação com outros ensaios bacterianos, como inibição de nitrificação, respirometria, luminescência de ATP e inibição de enzimas. A versatilidade do ensaio aumentou com a modificação subsequente, ou seja, o ensaio cinético para amostras turvas e coloridas e o teste de fase sólida para analisar a toxicidade do sedimento (53).

Entre os bioensaios *in vivo*, os ovos fertilizados de galinha e particularmente a vasculatura da membrana corioalantóica (CAM) são úteis como modelo para estudo da fisiologia de crescimento vascular; evolução e disseminação de câncer; triagem

de substâncias bioativas em ensaios pré-clínicos durante o desenvolvimento de fármacos; pesquisas em biomedicina e bioengenharia em engenharia de tecidos, interação de células tronco normais e tumorais com tecidos normais e estudos de sinalização celular, mas ainda não tinham sido exploradas em estudos ambientais para avaliação da poluição de água (54).

A CAM é formada durante o desenvolvimento aviário pela fusão das camadas mesodérmicas do alantoide e do córion. Essa estrutura se expande rapidamente, gerando uma rica rede vascular que fornece uma interface para a troca de gases e resíduos. A CAM permite estudar diversos tipos de estímulos sobre a formação de seus vasos em períodos relativamente curtos de tempo, por exemplo, enxertos de tecidos, células e fragmentos de tumores, medicamentos e substâncias angiogênicas e antiangiogênicas. A CAM é um modelo relativamente simples, rápido e de baixo custo, que permite a triagem de grande número de amostras farmacológicas em pouco tempo (54).

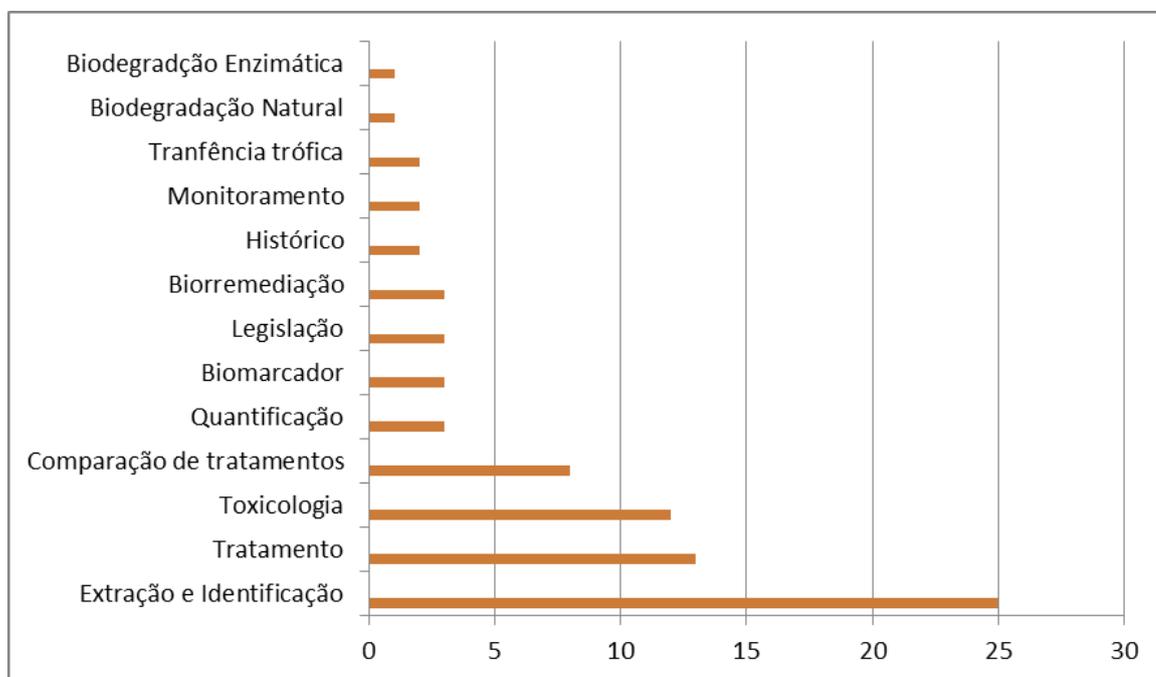
Uma revisão de literatura de 2021 apresenta a evolução estrutural da CAM, suas funções, características vasculares e sistema circulatório bem como seus fatores celulares regulatórios, com a finalidade de divulgar as maiores e recentes aplicações do modelo em análises de farmacocinética e biodistribuição, eficácia de drogas, testes toxicológicos e triagem em pesquisas pré clínicas farmacológicas (55).

O desenvolvimento metodológico proposto neste trabalho trata de relacionar a vascularização desse tecido extra embrionário de ovos de galinha, cujo desenvolvimento é bem determinado, à toxicidade de uma substância descrita como antiangiogênica e interferente endócrina e, para a qual ainda existem desafios analíticos a enfrentar, no âmbito da avaliação de contaminação ambiental. A intencionalidade é desenvolver parâmetros indicadores capazes de auxiliar no monitoramento à contaminação ambiental de águas superficiais contendo substâncias-traço, com atividade glicocorticoide.

2 MOTIVAÇÃO/JUSTIFICATIVA

O problema ambiental relacionado aos fármacos contaminantes emergentes foi a principal motivação para este trabalho. Uma busca realizada no início de 2019 em sites internacionais de pesquisa, utilizando as palavras-chave “*emerging contaminants*” para trabalhos publicados a partir de 2008, retornou 99 artigos no Scifinder, 35 no Scielo e 9 no Lilacs. Mais da metade desses trabalhos tratavam de contaminantes emergentes derivados de fármacos. Nesse mesmo ano (2019), quando o desenvolvimento experimental de que tratou esse trabalho foi iniciado, os temas mais abordados sobre estes resíduos versavam principalmente em relação à sua identificação e extração, à toxicidade e aos tratamentos e recursos utilizados na descontaminação ambiental (Gráfico 2.1).

Gráfico 2.1 - Artigos sobre contaminantes emergentes de fármacos publicadas entre 2008 e 2019, disponíveis nas bases Scifinder, Scielo e Lilacs. Na coordenada os temas encontrados sobre o assunto e na abscissa o número de referências da ocorrência do tema



Fonte: A autora.

A contaminação de águas de consumo foi discutida em um terço dos artigos selecionados nesta revisão. No caso dos resíduos farmacêuticos, a busca pela identificação dos componentes persistentes, bem como o desenvolvimento de tratamentos terciários para eliminar estes resíduos têm dominado o panorama das pesquisas, nas últimas décadas.

A justificativa para a escolha de uma substância representante do grupo dos glicocorticoides foi o fato de que estes resíduos não são eliminados pelo tratamento convencional e algumas fontes de peso nesta poluição são inevitáveis. O impacto do uso da Dexametasona durante a pandemia da COVID-19 ainda não foi caracterizado, porque a tecnologia de análise não está amplamente disponível, mas o projeto foi desenhado antes de 2020, quando esse impacto nem poderia ser imaginado. Entretanto, os efeitos farmacológicos da Dexametasona como substância protótipo da classe são bem conhecidos e adequados para a prova de conceito do desenvolvimento metodológico. Amostras padrão da substância pura de grau farmacêutico são possíveis de obter comercialmente em farmácias de manipulação, as soluções utilizadas no laboratório têm boa estabilidade ao armazenamento e o manuseio experimental com o modelo pode ser realizado em um laboratório com nível de biossegurança e segurança química compatível com as instalações do laboratório M², onde o projeto foi realizado.

3. OBJETIVOS

a. Geral

Estudar a possibilidade de aplicar um bioensaio de angiogênese e teratogênese da membrana corioalantóica de embrião de galinha para a análise de Dexametasona em água

b. Específicos

Discutir as limitações para o controle ambiental da poluição química da água por glicocorticoides, considerando a tecnologia existente para a detecção desses compostos em águas de superfície

Discutir a aplicação do bioensaio de angiogênese e teratogênese ao estudo de amostras ambientais de águas de superfície.

Ampliar a discussão sobre os riscos à Saúde Pública e à preservação dos ecossistemas, associados à poluição química da água, envolvendo estudantes de graduação e pós-graduação, com finalidade de educação permanente alinhada aos objetivos do desenvolvimento sustentável.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais utilizados

4.1.1 Amostras biológicas

- ovos embrionados de galinha,

4.1.2 Reagentes, solventes e diluentes

- Dexametasona grau farmacêutico, adquirida em farmácia de manipulação,
- água deionizada filtrada (MILLI Q® ou equivalente, com filtro de membrana),
- álcool absoluto,
- álcool 70°,
- formaldeído 4%.

4.1.3 Vidraria, plásticos e materiais descartáveis

- balão volumétrico,
- provetas graduadas,
- ponteiros descartáveis para pipetador automático,
- tubos para procedimentos de fixação e armazenamento dos embriões (cônicos, para 40 mL ou equivalentes),
- placas de petri plásticas transparentes 90x15mm,
- pipetas descartáveis de bulbo plástico, para 0,5 mL,
- pisseta,
- microtubos plásticos com tampa, capacidade de de 2,5 mL (Eppendorf® ou equivalente),
- suportes plásticos para pesagem de amostras,
- seringas e agulhas de insulina estéreis,
- agulhas estéreis 25 x 0.7mm ou 40 x 0,8mm,
- espátulas para pesagem,
- régua milimetrada.

- Equipamentos e instrumental de uso geral
- pipetadores automáticos para volumes ajustáveis calibrados (com fundo de escala em 1mL, 200µL, 20µL, 2µL),
- lupa estereoscópica,
- scanner de mesa de alta resolução,
- computador com interface com a internet e disco rígido para armazenamento das imagens, compatível com o programa de aquisição de imagens do scanner,
- espaço em nuvem para armazenamento e compartilhamento do banco de imagens.
- paquímetro,
- balança analítica,
- equipamento para registro fotográfico,
- foco de luz para apoio ao registro fotográfico,
- autoclave,
- chocadeira,
- cabine de segurança biológica com fluxo laminar,
- capela química ou sistema de exaustão para vapores químicos,
- geladeira comum.

4.1.4 Materiais de apoio

- gaze,
- estantes para tubos (vários tamanhos),
- caixa para descarte de material perfuro-cortante,
- sacos de lixo brancos,
- materiais gerais para limpeza de vidraria e de instrumental cirúrgico delicado (Extran® e sabão líquido neutro),
- papel pardo,
- fita indicadora para autoclave,

- fita crepe comum,
- Equipamentos de proteção individual (EPI): gorro, luvas nitrílicas ou de borracha sem talco, avental, sapatos fechados,
- Peças cortadas de EVA e TNT coloridos, para contraste e redução de reflexos durante a documentação fotográfica.

4.1.5 Ovos embrionados de *Gallus domesticus*

Foram utilizados 144 ovos fornecidos pela empresa Só Orgânicos - Comércio de Alimentos Orgânicos LTDA, com inscrição CNPJ n. 21.934.488/0001-02, através do entreposto Instituto Baru, com endereço na Rua Boturoca, 206 – Butantã-São Paulo. Os ovos utilizados nos ensaios foram fornecidos com a identificação da data de postura, inferior a sete dias. Foram armazenados no laboratório à temperatura ambiente e utilizados dentro de um intervalo de 48h. Não houve problemas de viabilidade associados ao fornecimento. Quando riscos de interferência foram identificados, por exemplo interrupção na energia elétrica por problemas na rede ou dedetização no prédio, os ensaios foram interrompidos.

4.1.6 Instrumental cirúrgico

Para a realização dos procedimentos, foram utilizadas pinças delicadas Dumont oftálmicas retas (E 15) e curvas 45° (EDS 15), sem ranhuras, tesouras delicadas 22 mm com ponta fina, retas e íris curvas. Todos os materiais foram lavados com esponja e sabão líquido apropriado (Extran® neutro ou similar), enxaguados com água corrente para remoção de resíduos orgânicos, depois enxaguados com água destilada para eliminar resíduos metálicos, secos e acondicionados em caixas de aço inoxidável com tampa, próprias para uso em autoclave.

4.1.7 Autoclave

O material cirúrgico foi esterilizado antes do uso em uma autoclave (Cristófoli Vitale Class 12L), depois de adequadamente embalado e acondicionado em caixas de aço inoxidável e/ou em papel pardo e etiquetado com fita indicadora própria para autoclave. Materiais como ponteiras, gaze e tubos para diluição das amostras foram dispostos em frascos de vidro resistentes e cobertos com tampas de rosquear, metálicas, de forma a permitir a entrada do fluxo de vapor durante a autoclavagem ou acondicionados em caixas adequadas e embalados em papel pardo. Uma fita indicadora foi posicionada na superfície externa de cada embalagem, como forma de controle do processo de esterilização pelo aparelho. Após a limpeza externa, as caixas metálicas e outros materiais foram colocados na autoclave. Foi adicionado volume adequado de água Milli-Q e a autoclave foi programada para esterilização de materiais cirúrgicos (ciclo longo). Ao final do ciclo automático do equipamento, o material foi retirado e guardado, sem a violação da embalagem externa até o momento do uso. A manutenção da autoclave do laboratório é realizada periodicamente, conforme recomendação do fabricante, com a troca de filtros e validação externa. O dimensionamento da rede elétrica, com cabos grossos para suportar correntes elevadas, bem como o escoamento de água estão de acordo com as instruções do manual do equipamento para sua instalação (48).

4.1.8 Cabine de segurança biológica com fluxo laminar

Os manejos invasivos foram realizados em cabine de segurança biológica com fluxo laminar Purifier® da marca Labconco®. Para reduzir os riscos de contaminação das amostras, foram utilizados os devidos EPIs (luvas e máscaras). Uma limpeza do interior da cabine foi realizada para descontaminação inicial, borrifando-se álcool 70% em toda a bancada de trabalho e nos instrumentos a serem utilizados, seguindo-se exposição à luz UV, por 15 min, antes de utilização. Os materiais que foram introduzidos na cabine durante o manejo dos modelos tiveram sua superfície externa limpa com álcool 70°. Ao fim do procedimento, toda a superfície interna da cabine de fluxo laminar foi novamente higienizada com álcool

70% e a porta foi fechada para a ação da luz ultravioleta, em nova exposição, por 15 minutos (56).

4.1.9 Incubadora de ovos

Os ovos foram incubados em uma chocadeira de marca Zagas®, modelo C421, com capacidade de receber até 42 ovos, ajustada para giragem automática durando 16 min a cada 2 h, atmosfera com umidade constante de 55% e temperatura de 37,2°C.

4.1.10 Materiais para captura e análise de imagem

Foram utilizados um scanner de mesa modelo Hewlett-Packard G2410 Scanjet acoplado a um notebook com software HP Central de Soluções instalado para a captura das imagens das membranas corioalantóica, utilizado no momento das coletas de amostras.

As imagens dos embriões foram obtidas com equipamento fotográfico simples (como a câmera do celular), no momento da coleta das amostras e medidas a fresco de comprimento (“*Crown-Rump*”). Depois de fixados, os embriões foram fotografados em lupa estereoscópica Nikon SMZ1800, para documentação do estadiamento, utilizando o software do fabricante. As imagens foram obtidas em aumento 1x (tamanho real), com a maior abertura de campo disponível para o equipamento, a iluminação foi ajustada com fibra óptica, para evidenciar os detalhes.

As imagens digitais obtidas com o scanner foram processadas por um programa dedicado, chamado CAM Ligia, escrito em Matlab 2017 pelo cientista da computação Leandro Tíclia de la Cruz. Esse programa foi utilizado para selecionar automaticamente as regiões de interesse para análise da morfologia das redes vasculares (ROIs), para segmentação das imagens (obtenção de imagens em duas cores, imagem binária), para identificação dos pontos de ramificação e pontos

terminais dos vasos e cálculos com as imagens binárias para análise de parâmetros relacionados aos padrões de contraste local (LBP), índices de ramificação, área de vasos e outras medidas.

Os dados e as imagens obtidas durante a coleta de cada um dos ensaios independentes foram armazenados na nuvem (Google Drive), em planilhas Excel e em pastas organizadas segundo o dia do ensaio, e compartilhadas com o grupo desde o momento da coleta das amostras. Os nomes dos arquivos e planilhas foram codificados de forma a facilitar o acompanhamento dos ensaios pelos especialistas no processamento das imagens e permitir que os resultados do processamento e das análises fossem inseridos na estrutura de documentação dos trabalhos em tempo real. Desta forma foi possível compor um conjunto coerente de dados, com rastreabilidade dos registros ao longo de todo o período de realização dos ensaios (mais de 18 meses).

4.2 Metodologia

4.2.1 Preparo das soluções de Dexametasona

Foram pesados 4,00 mg de Dexametasona base com espátula de aço previamente desinfetada com álcool 70° em papel próprio para pesagem numa balança analítica com precisão de quatro casas decimais.

Esta quantidade de Dexametasona foi transferida para um balão volumétrico de 50 ml previamente lavado com sabão neutro e desinfetado com álcool 70° cuja secagem ocorreu a temperatura ambiente.

Foi preparada uma solução de álcool 80° com o auxílio de provetas graduadas, utilizando-se álcool absoluto e água pura (MilliQ®) filtrada em membrana com poro de diâmetro 0,22µm. Esta solução foi empregada como veículo e utilizada para completar o volume de 50 ml do balão volumétrico contendo 4mg de Dexametasona.

Essa primeira solução de Dexametasona, de concentração 80 mg/L, foi utilizada como solução estoque padrão, base para as diluições, e foi armazenada em geladeira, com cobertura externa de papel alumínio para barrar a exposição à luz, pois a Dexametasona é fotossensível. Essa solução foi utilizada por três meses e descartada. Durante todo o período experimental foram elaborados três frascos de solução padrão, levando em consideração relatos obtidos da literatura, que descrevem não haver perdas na concentração de Dexametasona em soluções estocadas por até três meses e meio sob refrigeração (57).

Para uso, as diluições da solução estoque padrão foram realizadas com técnica asséptica. A limpeza do fluxo laminar foi realizada com álcool 70° e exposição a UV por 15 minutos. Toda a superfície externa do material utilizado nas diluições foi desinfetada com álcool 70° antes de ser introduzido no fluxo laminar. O frasco de solução estoque de Dexametasona e a solução de álcool 80° recém preparada foram inseridos no fluxo, para o preparo das soluções a serem utilizadas para a exposição dos ovos. Com auxílio de ponteiras descartáveis estéreis e pipetas automáticas, foi realizada a primeira diluição, de 1:1000 v/v (2µL da solução de Dexametasona 80 ng/L para 2 ml no eppendorf®). Esta operação foi repetida para a obtenção do primeiro ponto da curva padrão (80 ng/L). Os tubos utilizados para receberem as diluições foram tubos plásticos descartáveis estéreis, de fundo cônico, com capacidade para 2,5mL, com tampas plásticas (tipo eppendorf® ou vials de congelamento)

A solução do primeiro ponto da curva padrão foi diluída a 1:4 v/v, utilizando pipeta volumétrica com fundo de escala de 200µL e completando-se o volume para 800µL com pipeta com fundo de escala de 1 ml, obtendo-se o segundo ponto da curva, na concentração considerada limiar toxicológico para o meio ambiente (20ng/L), PEC do inglês, predicted environmental concentration, pelo ensaio CALUX® para glicocorticoides.

A solução de 80 ng/L de Dexametasona foi diluída também a 1:10 v/v (200µL da solução de Dexametasona 80 ng/mL para 2 ml finais, com o veículo) e assim se obteve o terceiro ponto da curva padrão, na concentração de 8 ng/L.

E finalmente este terceiro ponto também foi diluído a 1:10 v/v (200µL da solução 8 ng/mL para 2 mL finais, com o veículo) obtendo-se o quarto ponto da curva (0,8 ng/L).

O último ponto da curva padrão dose-efeito foi realizado com o veículo, sem a Dexametasona (concentração zero).

4.2.2 Procedimento do Bioensaio

O planejamento dos ensaios foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF), da Universidade de São Paulo (USP), e recebeu o número de protocolo CEUA 616/2020.

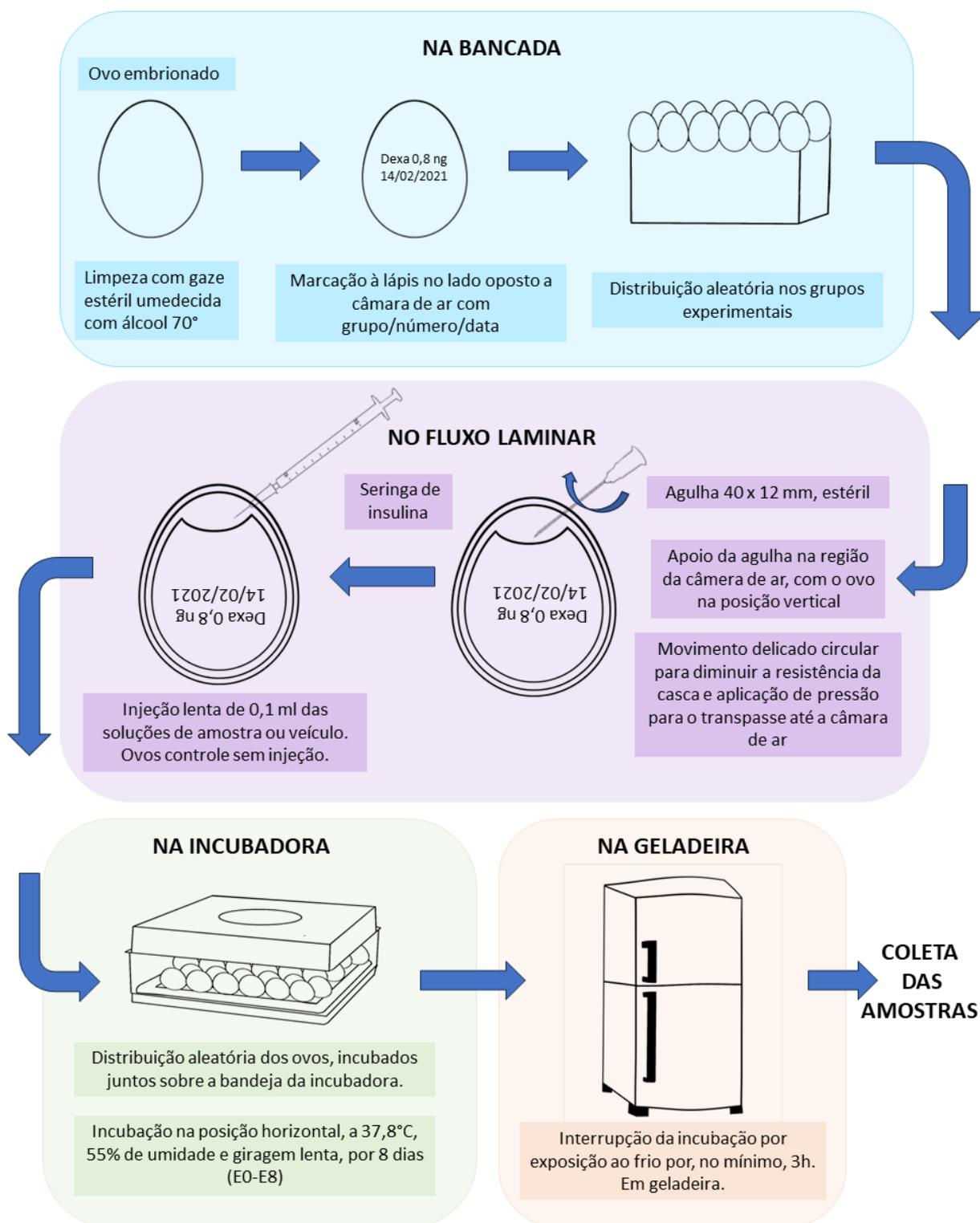
Os ovos embrionados de fornecedor certificado foram utilizados em no máximo 48 h. Antes do uso, foram limpos com gaze esterilizada embebida em álcool 70° e identificados na casca através de lápis com a data do experimento e o grupo em que seriam alocados. A distribuição dos ovos de cada remessa nos diferentes grupos foi aleatória, todos os grupos foram inicialmente contemplados com um número equivalente de ovos.

Cada experimento foi realizado com seis grupos (controle, veículo, Dexa 0,8 ng/L, Dexa 8ng/L, Dexa 20 ng/L e Dexa 80 ng/L) com 4 ovos para cada grupo perfazendo 24 ovos. Os ovos foram levados ao fluxo laminar e, tiveram sua casca perfurada delicadamente, com uma agulha de calibre 0.7mm. Depois, com auxílio de seringas estéreis de insulina, cada um dos ovos recebeu um volume de 0,1 ml (100µL) de uma solução da Dexametasona no veículo de diluição, com concentração correspondente à destinada ao grupo experimental em que foi alocado, exceto para os ovos do grupo controle, que não receberam nenhuma injeção. Os ovos do grupo veículo receberam apenas o veículo de diluição (concentração de Dexametasona igual a zero ng/L).

A seguir, os ovos foram colocados na chocadeira, sob giragem delicada, na temperatura e umidade próprias para a incubação da espécie, por 8 dias.

Ao final da incubação, os ovos foram retirados da chocadeira e colocados na geladeira, sob refrigeração, por 3h, no mínimo, para interromper o metabolismo e levar o organismo a um estado suspenso, em que o desenvolvimento é interrompido. Após este intervalo de tempo de resfriamento, os ovos foram retirados da geladeira, um a um, para os procedimentos de coleta.

Figura 4-1 Metodologia da exposição

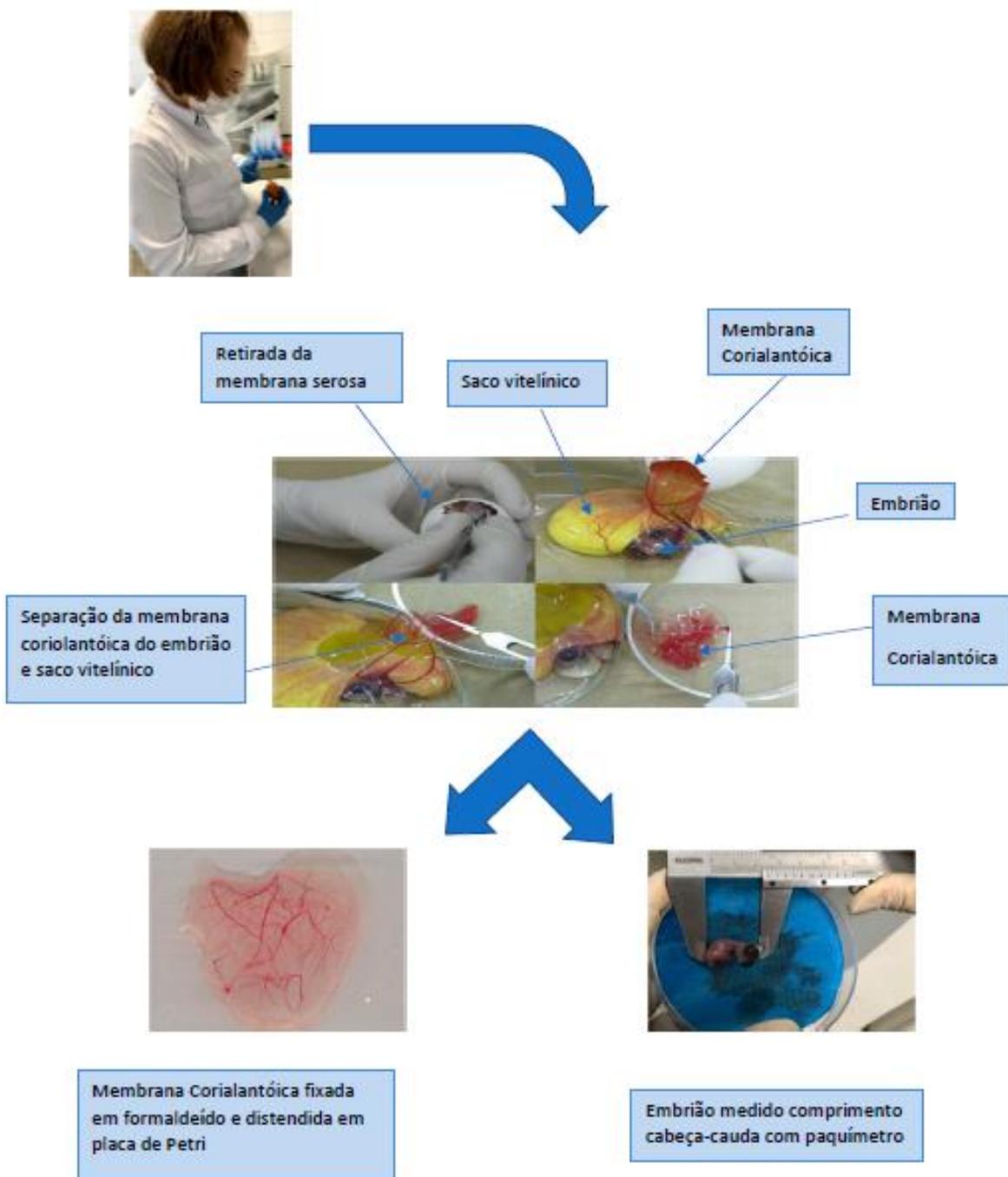


Fonte: A autora

Com o auxílio de uma tesoura curva esterilizada, o ovo foi aberto cuidadosamente, pela câmara de ar, e o seu conteúdo colocado em uma placa de Petri. A seguir com a ajuda de pinças delicadas, foram separados a CAM e o embrião.

A CAM foi transferida para uma placa limpa, distendida sem tensionamento e sobre ela foram colocadas algumas gotas de uma solução de formol 4%, para fixação. A seguir cada membrana foi colocada num scanner de alta resolução e a imagem digital foi gravada em arquivo colorido, em formato tiff ou jpeg, na resolução de 2400 dpi. Os arquivos de imagem correspondentes aos dados experimentais, contendo as imagens da CAM, foram nomeados e adequadamente organizados em um conjunto de pastas cuja estrutura de registro teve o objetivo de facilitar o uso de um registro permanente e rastreável dos dados. Os nomes dos arquivos permitem a identificação do ensaio, do grupo e da amostra a que cada imagem se refere, através de codificação padronizada. As imagens de cada ensaio foram armazenadas em pastas de imagens de acesso compartilhado, também com nomes codificados de fácil identificação, para que os outros pesquisadores do grupo tivessem acesso e posteriormente foram utilizadas no processamento e análise de imagens.

Figura 4-2 Metodologia da coleta



Fonte: Imagens cedidas pelo grupo de pesquisa

Cada embrião foi cuidadosamente limpo e pesado em balança analítica e seu comprimento foi medido com o auxílio de um paquímetro na dimensão cabeça-cauda.

Depois que as imagens e as medidas de peso e tamanho dos embriões foram obtidas, tanto a CAM quanto os embriões foram acondicionados em frascos contendo solução de formaldeído a 4%, para fixação. Todo o material remanescente foi acondicionado em sacos brancos e encaminhado para descarte de material biológico. A solução de formol foi substituída por álcool 70° após 48 h, para armazenamento do material. Os embriões foram mantidos nesta solução até o momento de documentação fotográfica, em lupa estereoscópica, para registro dos dados de macroscopia, para estadiamento. Foram obtidas imagens dos olhos, das patas, das asas, do bico, do topo da cabeça e de eventuais alterações estruturais encontradas na macroscopia. Após essa documentação, os embriões foram destinados para processamento histotécnico, com inclusão em parafina, para futura análise histológica.

Os parâmetros foram tabulados para análise estatística e analisados descritivamente.

Processamento e análise das imagens da CAM

As imagens da CAM foram processadas por programa desenvolvido para estas análises (CAM-Ligia). Nesta etapa, foram segmentadas em áreas de tamanho padronizado denominadas regiões de interesse (ROIs), convertidas em imagens em tons de cinza e em imagens binárias (preto e branco). A obtenção de imagens binárias de forma automática precisou ser validada e isso foi realizado através da construção de um conjunto de imagens binárias processadas manualmente, que constou das imagens de 32 ROIs, com representação de todos os grupos experimentais. Esse conjunto de imagens obtidas de forma manual foi considerado o padrão ouro para as etapas de teste e validação dos procedimentos automatizados.

Os parâmetros possíveis de serem medidos diretamente nas ROIs foram: densidade de área correspondente às imagens dos vasos, número de pontos de bifurcação e de pontos terminais presentes nas imagens, hierarquias de classificação dos vasos identificados em árvores ramificadas, diâmetros e comprimentos de segmentos de vasos, utilizados para o cálculo do índice de ramificação. Além disso, foram calculados os histogramas de distribuição de classes relacionadas ao padrão de contrastes locais dos pixels das imagens (LBP) e foi desenvolvido um procedimento para o cálculo de um parâmetro funcional, o coeficiente de Murray dos vasos presentes nas ROI, como estratégia para estabelecer uma correspondência entre a morfologia observada e padrões de funcionalidade da rede vascular. Cada parâmetro medido foi analisado para identificação de eventuais diferenças entre os grupos experimentais. Os valores obtidos foram representados em gráficos e apresentados na forma de uma curva dose-resposta.

5. RESULTADOS

5.1 Padronização e refinamento do bioensaio

Foram selecionadas as faixas de concentração para Dexametasona que refletissem as concentrações de interesse ambiental - 0,8 a 80 ng e, ao mesmo tempo apresentassem biocompatibilidade com o modelo (100 uL).

O manejo do modelo, utilizando ovos fechados e mantidos durante toda a incubação com a giragem padrão, as condições de exposição e os cuidados com o manuseio com os ovos diminuíram as perdas por contaminação, que não foram observadas durante o período.

Os ovos foram retirados um a um da geladeira para a coleta, depois que foi estabelecida a condição de metabolismo suspenso. Desta forma, as membranas foram coletadas em condição adequada e fixadas rapidamente com algumas gotas de formaldeído 4 %, distendidas imediatamente na placa de Petri de forma a preservar os vasos da rede da membrana original, permitindo a digitalização da imagem em scanner com alta resolução (2400 dpi),

A definição dos parâmetros utilizados para a análise dos efeitos sobre o embrião levou em conta uma dosagem que causasse baixa toxicidade e efeitos dose dependentes compatíveis com algum desenvolvimento ou sem efeito sobre o desenvolvimento (desejável), que foram posteriormente confirmados pela análise estatística. A preservação do material para histologia objetiva foi utilizada com a finalidade de avaliar efeitos subclínicos associados à efeitos já descritos na literatura para a Dexametasona, como alterações dos ossos longos (iniciadas a partir do 8º dia) e efeito teratogênico sobre a formação da crista do embrião com deformação do osso craniano.

A definição do formato do banco de imagens, nomes de pastas, nomes de arquivos, estratégias de compartilhamento imediato, formato dos arquivos de imagens e a estrutura das planilhas utilizadas permitiram fácil acesso aos dados

brutos para os pesquisadores envolvidos com o trabalho interprofissional, e o rastreamento dos detalhes de cada etapa do experimento, por toda a equipe.

O processamento das imagens foi realizado por um programa dedicado - CAMLigia, que fez automaticamente a binarização das imagens, identificou os pontos de ramificação e pontos terminais de vasos, desenhou os grafos com as hierarquias de ramificação e retornou a imagem dos vasos com as marcações de seus diâmetros. Durante o projeto, o programa recebeu melhorias e foi utilizado para o cálculo dos coeficientes de Murray, de forma semiautomática. (58)

Parâmetros globais da rede, presentes em trabalhos anteriores do grupo foram incluídos na análise e calculados de forma automatizada. Entre estes: densidade de vasos (área ocupada por vasos numa ROI padrão), índice de ramificação (descrito a partir do envoltório convexo dos grafos presentes na imagem, como a área complementar a área de vasos nas regiões de cobertura dos grafos identificados nas ROIs) (59), histograma dos padrões binários de contraste local (LBPs) (60, 61, 62). Os resultados foram apresentados em forma de gráficos do tipo box-plot para a densidade de vasos e os índices de ramificação e como perfil do histograma para os LBPs. Gráficos de correlação entre densidade de vasos e os índices de ramificação também foram obtidos.

O desenvolvimento de um procedimento automatizado para o cálculo do coeficiente de Murray das redes vasculares documentadas nas imagens digitais foi implementado como melhorias neste trabalho. O refinamento constou de uma análise manual inicial, seguida da aplicação de uma estratégia de cálculo para verificação da aplicabilidade desse indicador. Uma vez verificado, uma parte requerida do processamento da imagem foi automatizada e validada com a análise das imagens do conjunto de teste. O programa foi modificado para incluir o cálculo do coeficiente de Murray e disponibilizado para uso. O resultado é apresentado em gráfico do tipo box-plot.

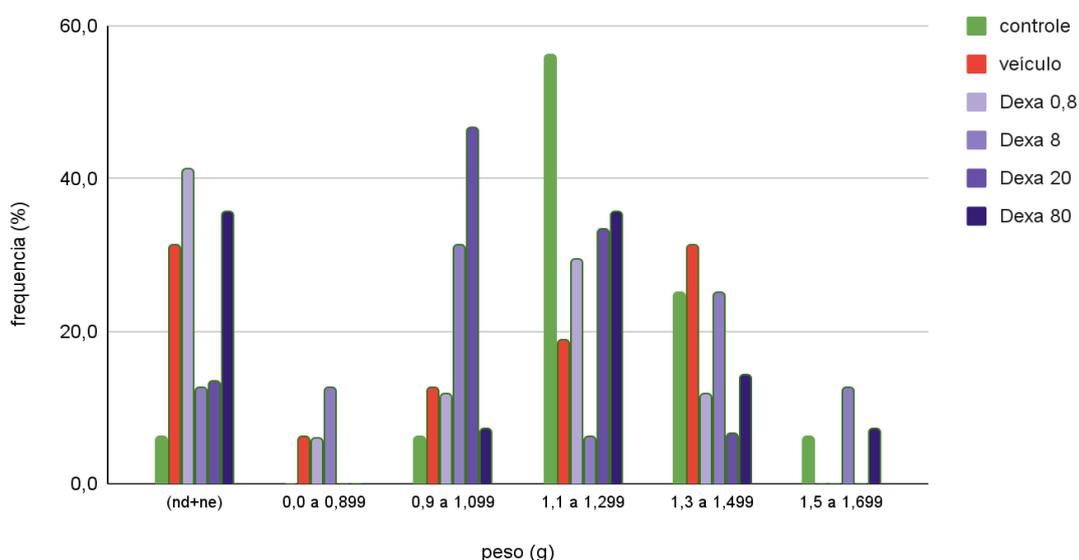
5.2 Curva dose-resposta

A aplicação do bioensaio *in ovo* foi testada numa faixa de concentrações de Dexametasona entre 0,8 e 80 ng/L, com exposição dos ovos a volumes de 100 μ L. Nessas condições, os diferentes grupos experimentais da curva dose-resposta mostraram uma boa compatibilidade com o composto, com pouca variação dos parâmetros observados em relação à viabilidade, desenvolvimento, tamanho e peso do embrião, como segue:

O embrião manteve o crescimento após a exposição a Dexametasona em todos os grupos. Esse resultado confirma que a faixa de concentrações selecionada para este estudo, de interesse ambiental segundo a literatura, também é adequada para o registro dos limiares de efeito no modelo escolhido. Os resultados da análise de dados realizada estão mostrados na tabela (Anexo B) e os histogramas de peso e tamanho estão mostrados nos gráficos 5.1 e 5.2.

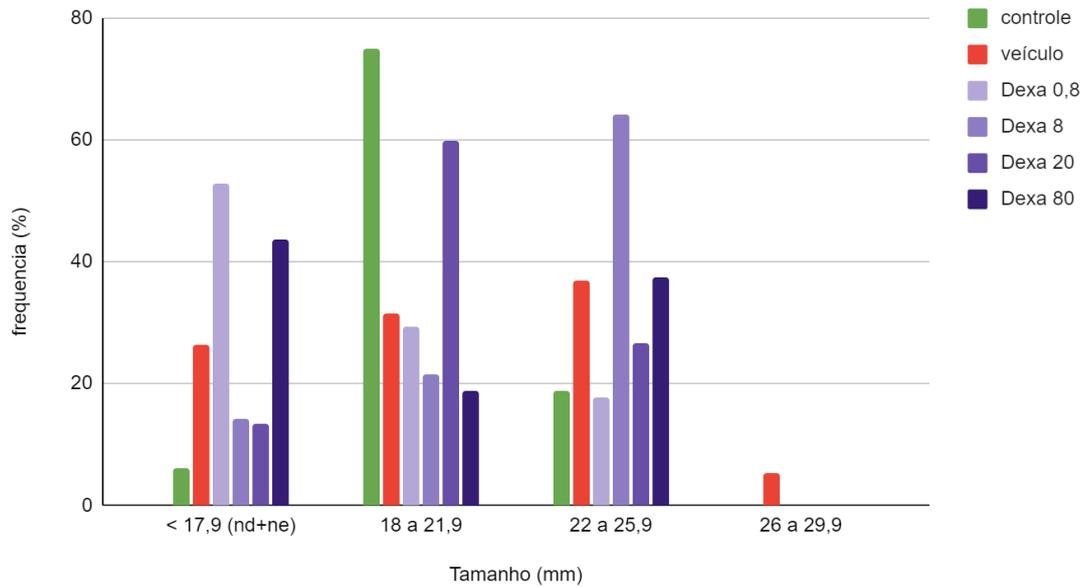
As diferenças não foram significativas para a população.

Gráfico 5.1 - Efeito de Dexametasona sobre o peso do embrião



Fonte: A autora.

Gráfico 5.2 - Efeito de Dexametasona sobre o tamanho do embrião



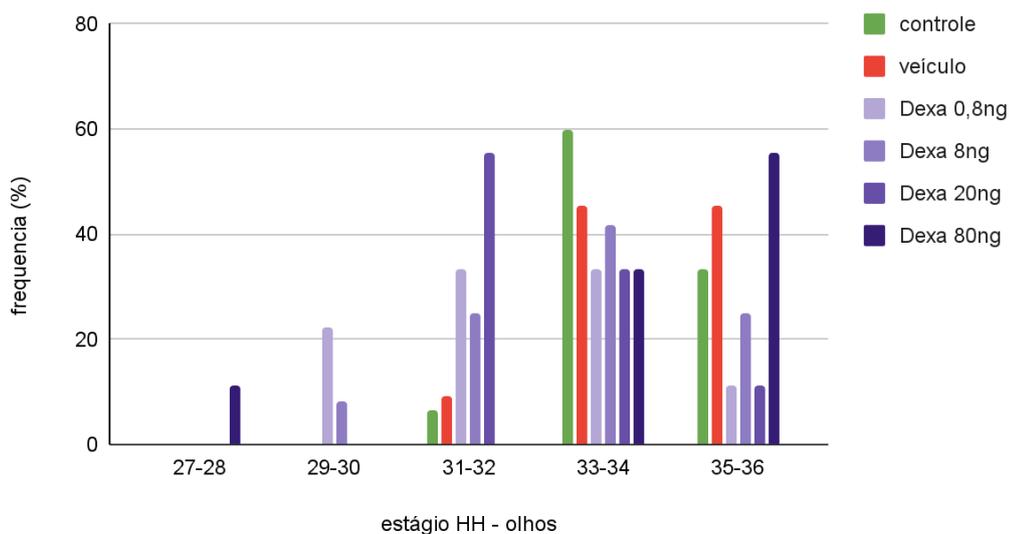
Fonte: A autora.

A população estudada não mostrou um comportamento compatível com uma distribuição normal, embora esse seja o comportamento esperado para a distribuição dos parâmetros de peso e tamanho dos embriões controle. Um teste estatístico, aplicado apenas aos grupos não expostos, mostrou que a distribuição do tamanho dos embriões apresenta, de fato distribuição normal para esse conjunto de amostras. Entretanto, o peso dos embriões não seguiu o mesmo perfil. No caso desses resultados, é possível observar que o peso dos animais controle sofre efeito importante da exposição ao veículo, desloca a distribuição desse subgrupo para valores maiores. Assim, a reunião dos dois grupos não expostos à Dexametasona resulta num grupo com uma distribuição alargada. Como o número de amostras, por grupo, é pequeno, não foi possível analisar cada grupo individualmente. De acordo com os resultados obtidos para o conjunto de amostras a população teve que ser analisada por métodos estatísticos não paramétricos (Anexo C).

Os resultados do estadiamento dos embriões foram analisados e também exibiram diferenças sutis. Os histogramas foram semelhantes e apareceram diferenças apenas no grupo com a dose menor em todas as estruturas observadas para o estadiamento e no grupo com a segunda menor concentração, no estadiamento do olho, mas não das outras estruturas. Esse conjunto de

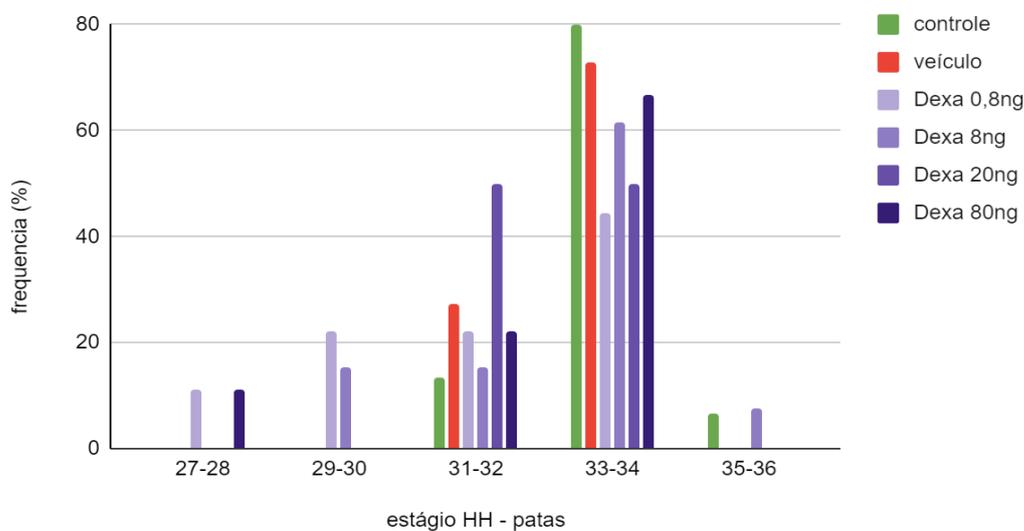
observações pode ter algum significado biológico, mas precisará ser confirmado, uma vez que as doses mais altas não mostraram diferenças com o controle e os efeitos esperados da Dexametasona são dose-dependentes. Os histogramas, por estrutura, estão mostrados nos gráficos 5.3, 5.4, 5.5 e 5.6.

Gráfico 5.3 - Efeito de Dexametasona sobre o desenvolvimento – estágio HH olhos



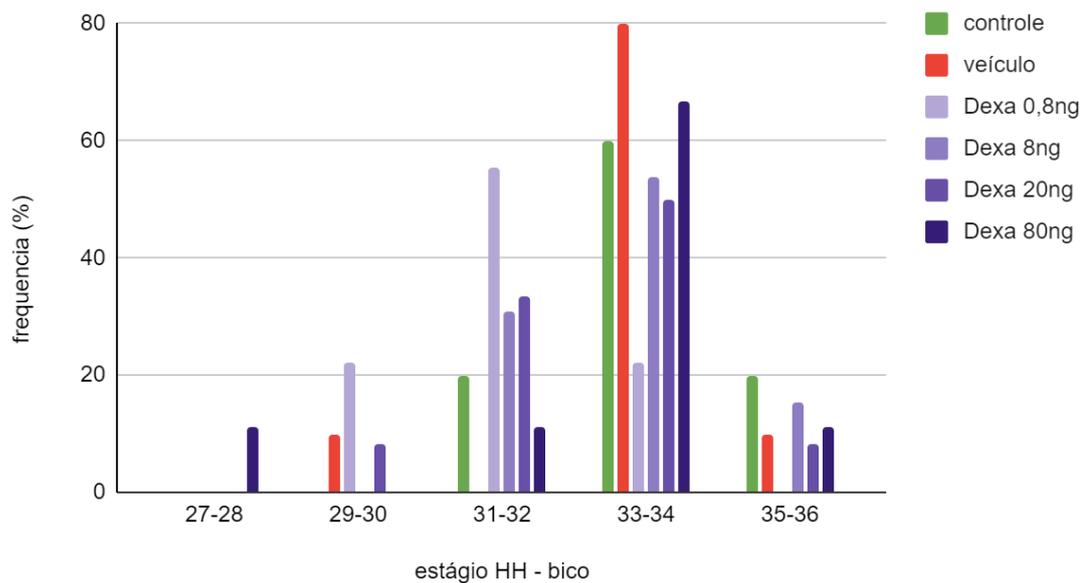
Fonte: A autora.

Gráfico 5.4 - Efeito de Dexametasona sobre o desenvolvimento – estágio HH patas



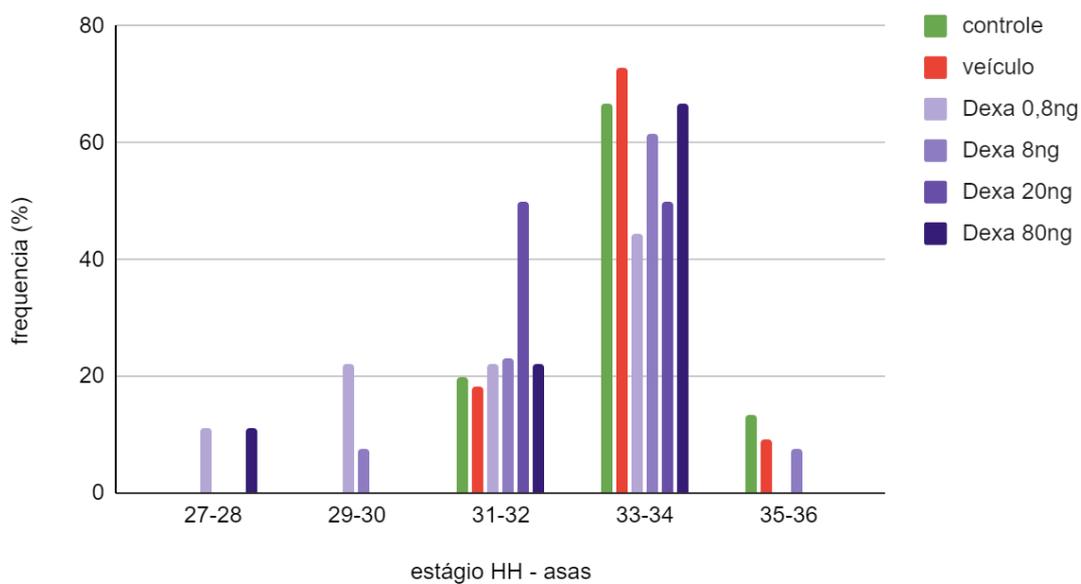
Fonte: A autora.

Gráfico 5.5 - Efeito de Dexametasona sobre o desenvolvimento – estágio HH bico



Fonte: A autora.

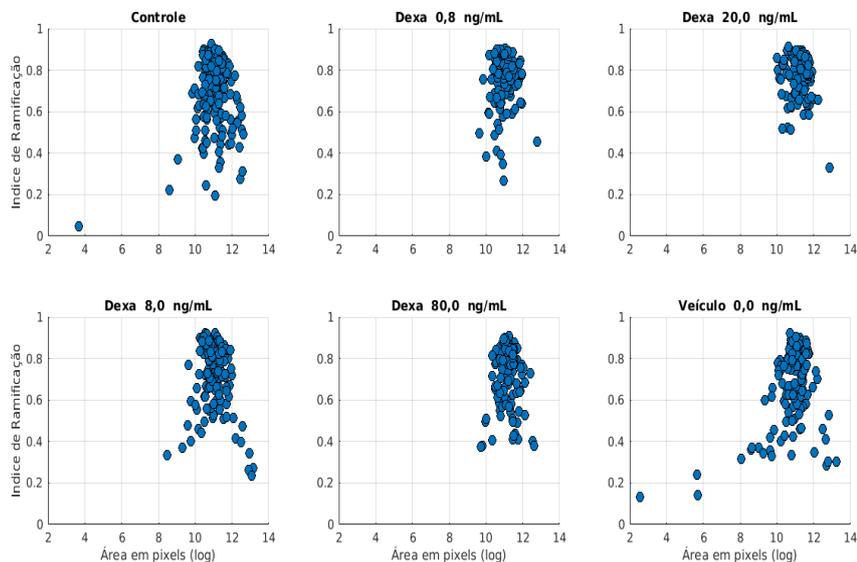
Gráfico 5.6 - Efeito de Dexametasona sobre o desenvolvimento – estágio HH asas



Fonte: A autora.

O efeito da Dexametasona sobre os tecidos extraembrionários foi evidenciado através da análise da vasculatura da membrana corioalantóica. A primeira análise da morfologia da rede vascular, por inspeção visual das imagens digitais, sugeriu que os efeitos da exposição à Dexametasona nas concentrações testadas corresponderiam a uma diminuição da representação de vasos pequenos da microcirculação, com evidenciação dos vasos maiores, que apareceram mais calibrosos nas imagens. Esses resultados foram mais frequentes nos grupos experimentais expostos às concentrações mais elevadas de Dexametasona, mas não foram observados em todas as imagens do grupo exposto à maior concentração, nem apareceram apenas nesse grupo ocorrendo também após a exposição a concentrações mais baixas. Em todos os grupos expostos a Dexametasona, foram observados efeitos gerais sobre a vasculatura, com mais intensidade e frequência após exposição às doses mais altas. Esses efeitos compreendem um grande número de anastomoses e vasos com ramificações triplas, vasos curvos, bifurcações próximas em vasos de calibre médio, produzindo percursos paralelos de vasos finos e perda da hierárquica típica de distribuição das ramificações. A exposição ao veículo não mostrou o mesmo tipo de efeitos, causando uma variação de calibre com dilatação de vasos menores e desorganização dos trajetos, sugerindo toxicidade. O tamanho das membranas não pareceu diferente entre os grupos. Todos os grupos de exposição à Dexametasona mostraram embriões e membranas que conseguiram, de alguma maneira, manter a viabilidade e o crescimento, apesar das alterações observadas. A estabilidade das densidades de áreas de vasos nas imagens e dos valores de incidência de ramificação confirmaram esse resultado, como mostra o gráfico 5.7.

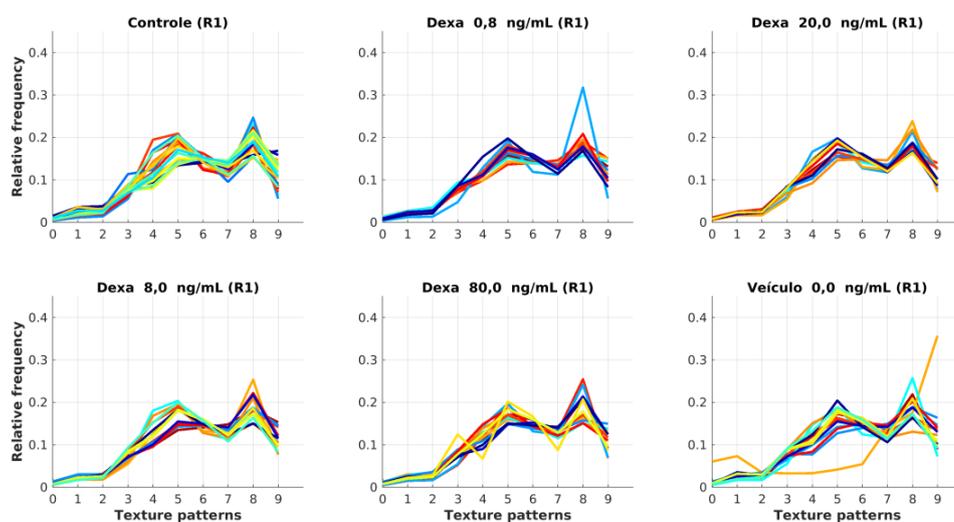
Gráfico 5.7 - Parâmetro de índice de ramificação executados pelo programa CAMLigia



Fonte: A autora.

Dentre os parâmetros medidos, o histograma de frequência dos padrões binários de contraste local também mostrou considerável estabilidade entre os ensaios e entre os grupos (Gráfico 5.8).

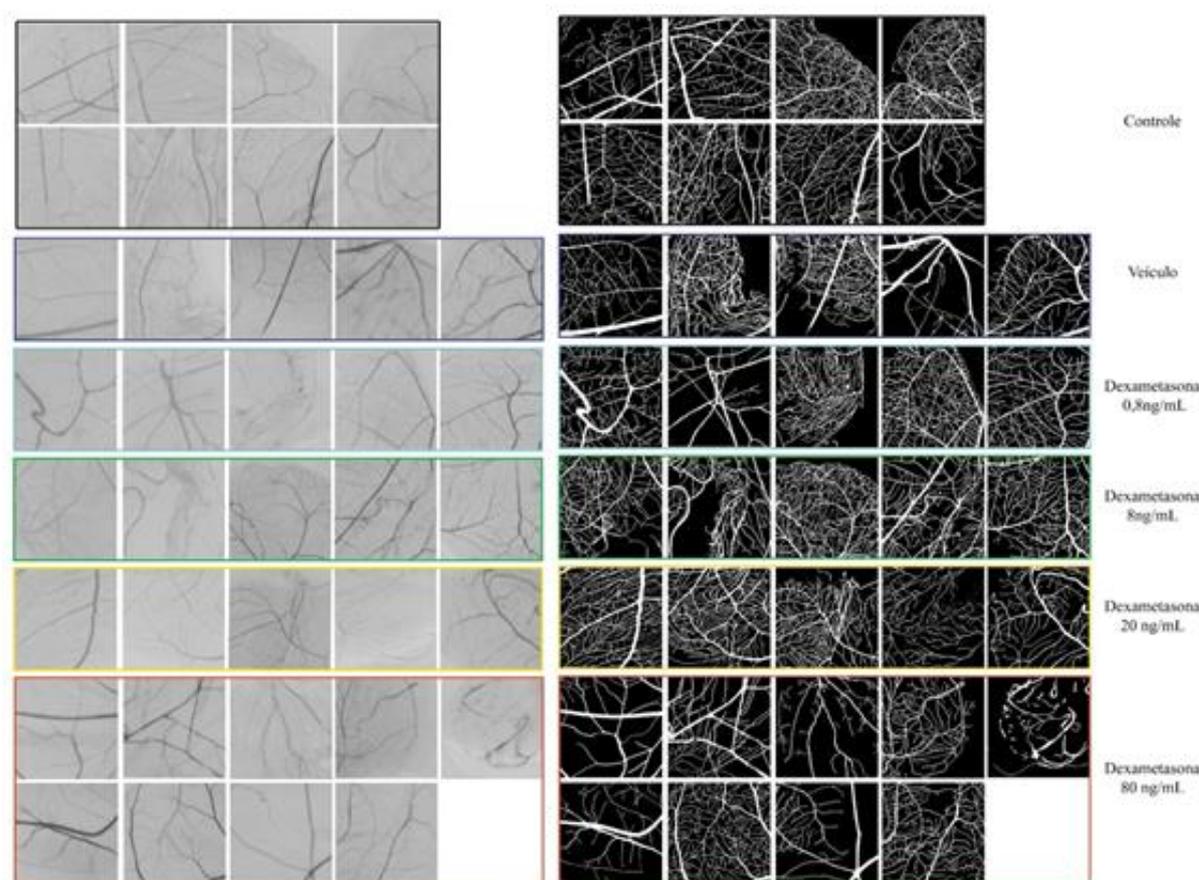
Gráfico 5.8 - Histograma de frequência dos padrões binários de contraste local



Fonte: A autora.

Diante dos resultados obtidos com a avaliação dos índices de ramificação e os padrões de contraste binário local, foi preciso desenvolver um indicador que refletisse o fenômeno observado nas avaliações iniciais, por inspeção visual. A primeira etapa foi a binarização manual de um conjunto de imagens que foram utilizadas para validação dos resultados obtidos com a automatização dos procedimentos analíticos. A binarização automatizada foi realizada com o auxílio do programa CAMLigia. Os resultados, para um conjunto de 32 imagens, estão mostrados na figura 5.1.

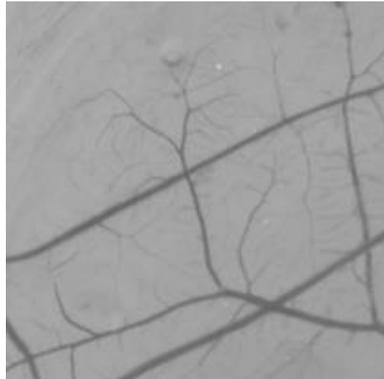
Figura 5-1 - Processamento manual de imagens CAM para validação do método automático



Fonte: A autora.

Numa segunda etapa, o programa foi utilizado para marcar os grafos e identificar o contorno dos vasos automaticamente, com uma intervenção do operador apenas para delimitar o percurso do grafo escolhido nas regiões de sobreposição, como mostrado nas figuras 5.2 a 5.5.

Figura 5-2 - Região de interesse (ROI) de uma membrana escaneada



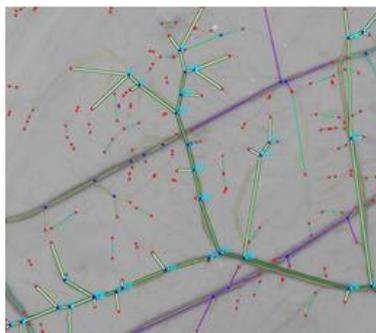
Fonte: A autora.

Figura 5-3 - Transformação da imagem da ROI em imagem binária pelo programa CAMLigia



Fonte: A autora.

Figura 5-4 - Identificação do grafo correspondente ao vaso ramificado pelo programa CAMLigia



Fonte: A autora.

Figura 5-5 - Identificação das forquilhas para o cálculo manual do coeficiente de Murray



Fonte: A autora.

O contorno dos vasos e as forquilhas marcadas foram utilizados, então, para testar a possibilidade de medir o coeficiente de Murray, selecionando-se manualmente os diâmetros com a ajuda do programa Figma, versão online, gratuita. Esse programa forneceu a imagem marcada em vermelho e as medidas dos segmentos utilizados para fazer essa marcação manual. As medidas dos vasos pais e dos vasos filhos foram colocadas em uma planilha e o valor do coeficiente de Murray foi calculado utilizando-se um programa em Python, que aproxima o valor por um método de interpolação, cedido pelo estudante de engenharia Gabriel Raniere Gomes Silva. O código fonte está mostrado abaixo:

```

def bisection (a, b, func, t = 0001, p = 1):
    lowerBound = a
    upperBound = b
    p_0 = 0,5 * (lowerBound + upperBound)

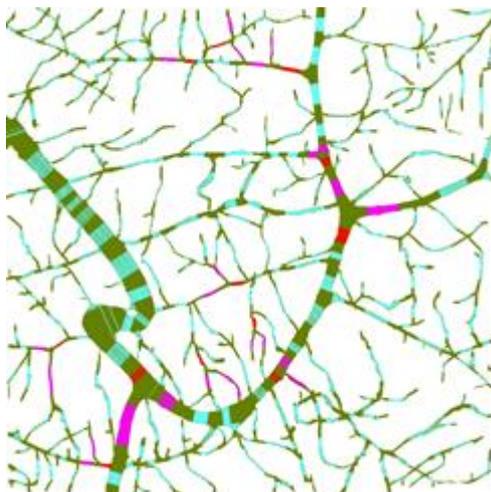
    value = func(p_0)
    if value == 0 or abs(p - p_0), t:
        return p_0
    elif not (bool(value < 0) ^ bool(func(a) < (0))):
        return bisection (p_0, b, func, t, p_0)
    else
        return bisection (a, p_0, func, t, p_0)

print (bisection (a,b, lambda m: (Dvasopai)**m - (Dvasofilho1**m +
Dvasofilho2**m)))

```

No estudo piloto com a técnica manual, foram utilizadas três imagens para o cálculo dos valores do coeficiente de Murray. Os resultados foram promissores, o modelo foi sensível para as alterações esperadas e confirmou as observações visuais. O estudo foi estendido para um subconjunto de imagens binárias do grupo de validação. Nesta etapa do desenvolvimento do método, as forquilhas ainda foram selecionadas manualmente, mas os diâmetros dos vasos foram calculados automaticamente, em imagens como as mostradas na figura 5.6.

Figura 5-6 - Identificação do vaso pai e dos vasos filhos nas forquilhas de Dexa 0,8 ng ROI 5

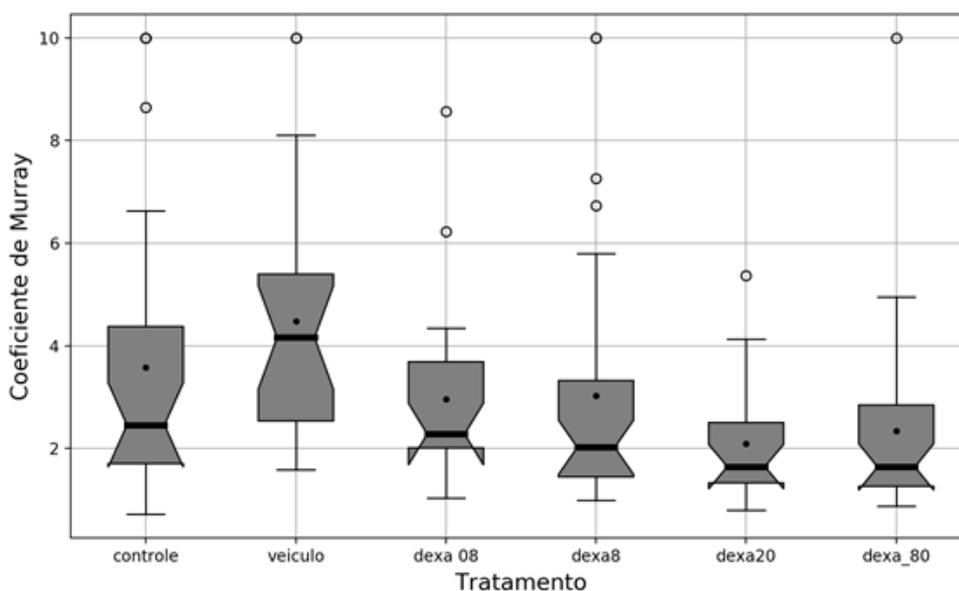


Fonte: A autora.

O programa de cálculo do coeficiente de Murray utilizado neste trabalho foi disponibilizado pelo autor e incorporado ao programa CAMLigia, como ferramenta analítica.

As imagens experimentais foram então analisadas e os coeficientes calculados para um conjunto de imagens de cada grupo e reunidos num gráfico descritivo, no formato box-plot, como mostrado na figura 5.7.

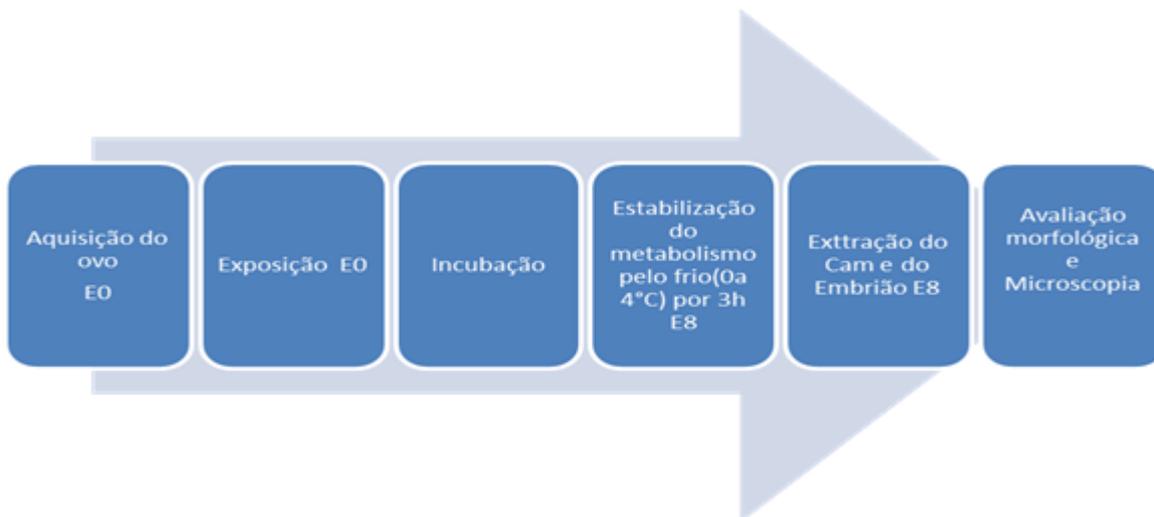
Figura 5-7 - Curva dose-resposta das concentrações de Dexametasona



Fonte: A autora.

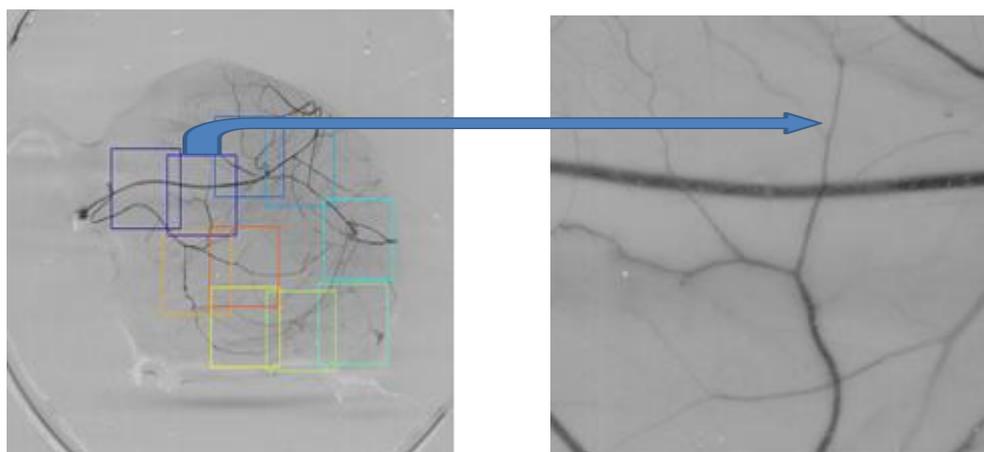
Foi possível verificar uma variação no valor de coeficiente de Murray para os grupos tratados com Dexametasona em relação aos grupos controle e veículo. Os coeficientes de Murray medidos no grupo exposto ao veículo também mostraram diferenças em relação com o grupo controle, compatíveis com os efeitos inicialmente observados e, também, com o efeito esperado da Dexametasona sobre o modelo. A diminuição do valor do coeficiente de Murray para valores abaixo de 2, com uma tendência de correlação com os valores de exposição dos diferentes grupos sugere um efeito dose-resposta. Esse resultado precisa ser confirmado com um número maior de pontos experimentais. Se confirmado, será possível afirmar que o organismo em desenvolvimento tem sensibilidade para a substância testada nas concentrações de interesse e que o coeficiente de Murray pode funcionar como bio indicador de exposição a Dexametasona (Figuras 5.8, 5.9 e 5.10).

Figura 5-8 - Procedimentos técnicos amostras biológicas



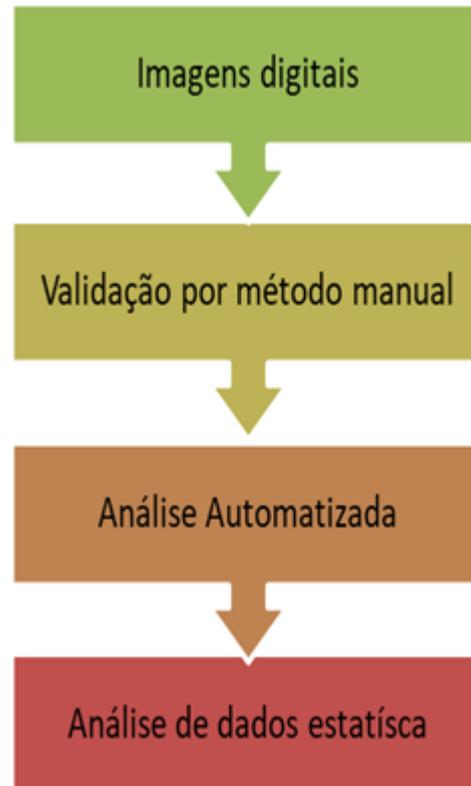
Fonte: A autora.

Figura 5-9 - Procedimento extração e escaneamento imagem CAM: Fluxograma e imagens. Primeira imagem, acima e à esquerda: Roi escolhida; segunda imagem, acima e à direita, membrana escaneada; terceira imagem, abaixo, membrana digitalizada



Fonte: A autora.

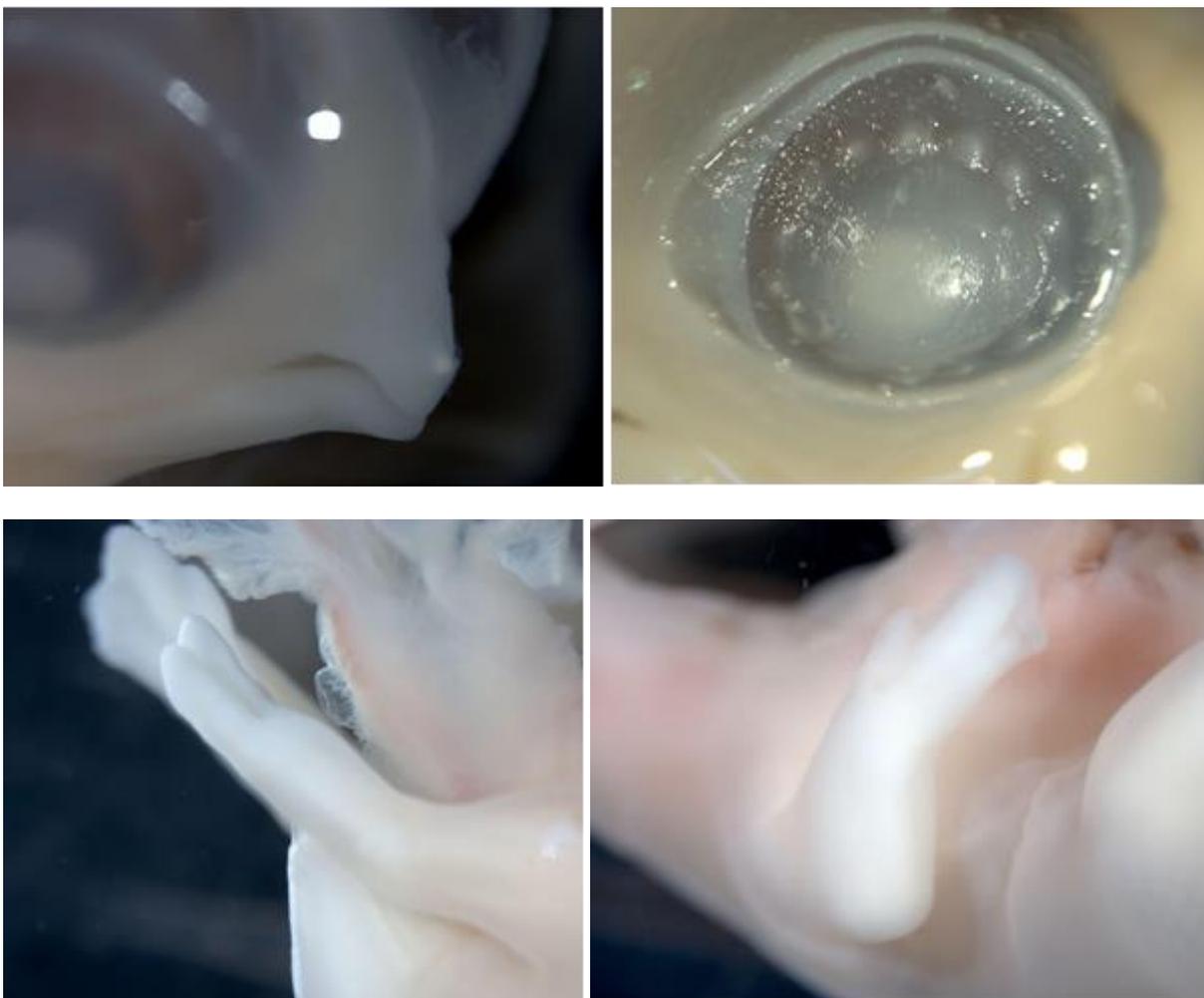
Figura 5-10 - Processo de validação da Imagem



Fonte: A autora.

Os embriões foram colocados em placas de Petri e fotografados em lupa estereoscópica Nikon SMZ1800, utilizando iluminação adequada para realce e foram documentados para estadiamento levando em conta a escala de desenvolvimento de Hamburger e Hamilton (63). Foram levados em consideração os seguintes parâmetros: olhos, asas, pés e bicos (Figura 5.11).

Figura 5-11 - Fotos do estadiamento dos embriões segundo os parâmetros: bico, olho, patas e asas



Fonte: A autora.

6. DISCUSSÃO

Os modelos de ensaios da membrana corioalantoica (CAM) de galinha e de codorna representam plataformas experimentais robustas para o estudo da angiogênese, que reflete a perturbação do crescimento de toda a árvore vascular. Essa abordagem experimental, quando combinada com a morfometria fractal ou outras técnicas de morfologia quantitativa, é sensível a alterações no padrão e na densidade de ramificação vascular (64).

O ensaio se constituiu numa experiência exploratória com a finalidade de avaliar a possível adaptação do modelo CAM para uso com amostras ambientais.

Para isto partimos da premissa que muitas substâncias testadas em CAM estavam presentes em baixíssimas concentrações e ainda assim o método se mostrou capaz de mostrar alterações na rede, o que seria de grande utilidade para uma mostra ambiental de águas superficiais caso a sensibilidade do teste se mostrasse positiva, pois evitaria o procedimento da concentração de amostra que normalmente acarreta subprodutos e outros efeitos indesejáveis (podendo levar inclusive à morte do animal).

A Dexametasona é descrita como teratogênica (51). Os efeitos de substâncias teratogênicas sobre o desenvolvimento podem ou não se apresentar como dose-dependentes. Muitas vezes, afetam diferentes alvos, correlacionando-se com quais estruturas em desenvolvimento em uma determinada etapa sejam alvos sensíveis aos efeitos diretos ou produzidos como eventos indiretos de uma ação anterior. A viabilidade é relevante para que desdobramentos de eventos indiretos sejam detectados. Assim, os efeitos podem ser de interrupção ou mudanças temporais do desenvolvimento ou de produção de alterações estruturais e funcionais sobre os embriões e fetos. Não é possível excluir que o atraso no desenvolvimento observado na exposição às concentrações baixas de Dexametasona seja devido a algum tipo de efeito teratogênico, uma vez que o veículo não mostrou atraso no estadiamento em relação ao controle. Entretanto, como não foi observado efeito de doses mais altas, também não é possível excluir que se trate de um achado eventual. Um

número maior de amostras e a avaliação histológica dos embriões deve ajudar a esclarecer esse achado.

Com relação a CAM pudemos observar alterações visuais sutis na rede vascular para todas as amostras, sugerindo que a Dexametasona começa a exercer seus efeitos sobre esta estrutura desde a concentração de 0,8 ng/L. Esse efeito é dose dependente e cresce até a concentração de 20ng/L, enquanto que na concentração de 80 ng/L, parece haver uma perturbação maior na rede provocando um aspecto diferenciado nos vasos pais que são mais calibrosos e os filhos e tendem a se bifurcar mais rapidamente, com regiões maiores sem representação de vasos finos e com poucos vasos anastomosados. Esse efeito precede alterações descritas sobre o crescimento dos ossos do embrião, que pode ser um parâmetro de avaliação para a sequencia da validação do método.

Os histogramas de distribuição dos Padrões Binários de contraste Local (LBP) mostraram-se pouco sensíveis à toxicidade do produto e nos forneceram um parâmetro de reprodutibilidade do método, pois poucas variações ocorreram ao longo do tempo em que os experimentos foram realizados, considerando comparações intra- e interensaios desses resultados. Em estudos anteriores do grupo com a β_2 -glycoproteína I, teratogênica, observaram-se grandes variações nos histogramas LBP (62), confirmando a literatura e as observações de que a faixa de concentrações testadas da Dexametasona é uma faixa de doses baixas, mas para as quais é possível observar efeitos sobre a CAM.

Para buscar uma forma de demonstrar o fenômeno, decidimos aplicar o coeficiente de Murray, que é um parâmetro que descreve o comportamento do fluxo vascular e não somente a estrutura da árvore vascular.

O Coeficiente de Murray é um parâmetro empírico relacionado à capacidade de um sistema ramificado de transporte de fluidos cumprir um compromisso adequado de condução e distribuição de seu conteúdo. O cálculo desse coeficiente leva em conta efeitos complexos sobre os calibres dos diferentes ramos e as relações hierárquicas que eles estabelecem, considerando a energia necessária para que o sistema funcione. No caso de árvores ramificadas de vasos sanguíneos, o valor do coeficiente de Murray associa-se à capacidade dos vasos de irrigar e drenar os tecidos e sua variação pode corresponder a mudanças em parâmetros globais, como pressão de oxigênio (PO_2) e estresse de cisalhamento. O coeficiente

de Murray pode ser calculado a partir do enunciado original, que estabelece a relação entre os calibres dos vasos de uma bifurcação como:

$(D^m = d1^m + d2^m)$ onde o diâmetro do vaso pai (D) elevado ao coeficiente de Murray (m) é igual a soma dos diâmetros dos vasos filhos (d1 e d2) elevados ao mesmo coeficiente (65).

Calculado o coeficiente de Murray associado às estruturas das árvores vasculares de um conjunto piloto de amostras (dos grupos Controle e Dexa 80 ng/L), feito de forma manual, obtivemos valores diferentes. Neste caso, encontramos para o grupo Dexa 80 ng um coeficiente abaixo do considerado típico, que está entre 2 e 3 para a maioria dos sistemas ramificados condutores associados a organismos vivos. O valor encontrado para o grupo controle se manteve no intervalo considerado típico (66).

Expandimos estes resultados encontrados para mais amostras, só que desta vez de forma automática pelo programa CAMLigia, e observamos o mesmo comportamento.

A possibilidade do cálculo do coeficiente de Murray ser realizado de forma automatizada pelo programa CAMLigia permitiu avaliar um número bem maior de forquilhas nas ROIs, e agilizar os resultados de análise das imagens (embora nesta etapa a marcação das forquilhas continue sendo feita através de observação pelo pesquisador). Marcada a forquilha, o programa calcula automaticamente o diâmetro do vaso pai e dos vasos filhos para o cálculo de Murray.

O fato do coeficiente medido ter sido menor, no caso das amostras expostas à Dexametasona, sugere que os calibres dos vasos sejam reduzidos mais abruptamente nas transições das forquilhas deste grupo. Como a efetividade da vascularização de um sistema de transporte depende dessas relações estruturais, é provável que haja um efeito deletério da Dexametasona sobre a vasculatura, relacionado ao estresse, e que este possa ser detectado precocemente a partir de uma análise automatizada.

Estes resultados iniciais são promissores e nos sugerem que o ensaio da CAM possa ter sensibilidade suficiente para identificar atividade glicocorticoide em soluções diluídas o que representaria uma vantagem adicional da não necessidade de concentração de amostra.

Além disso, o ensaio é de baixo custo em relação ao empregado hoje para monitorização de glicocorticoides na cidade de São Paulo.

7. CONCLUSÕES

O bioensaio é promissor no sentido de que é possível sua aplicação para detectar as concentrações de Dexametasona existentes em águas superficiais do ambiente urbano e que são de interesse para análise ambiental, sem a necessidade de concentração das amostras coletadas.

A necessidade de concentrar amostras e o custo dos testes atualmente disponíveis para detecção de glicocorticoides representam uma limitação ao monitoramento da sua presença em águas de consumo humano e animal.

O fato de que alterações vasculares foram observadas no modelo da CAM desde o início da curva dose-resposta é um indicador de que o bioensaio possa ter uma boa sensibilidade para atividade glicocorticoide em amostras reais de análise de água. A maior automação do procedimento analítico favorece a utilização futura do modelo neste contexto de saúde pública.

Uma discussão sobre os riscos ecotoxicológicos e à saúde pública da contaminação química da água, bem como o nosso modelo de bioensaio proposto para monitoramento ambiental foram apresentados em evento de pós graduação da Faculdade de ciências Farmacêuticas USP (Fisiotox) com a finalidade de educação permanente voltada aos profissionais de saúde

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O bioensaio continua em processo de refinamento contando com o apoio interprofissional de profissionais de Informática, Farmácia, Biologia, Saúde Pública, Engenharia e Ciências Ambientais.

O aumento do número de experimentos poderia nos fornecer maiores informações sobre o fenômeno e um tempo maior de incubação E10 seria interessante para analisar também o início de outros efeitos fisiológicos como encurtamento dos ossos longos iniciados por volta do 8º dia, ainda sem necessidade de anestésiar o animal.

Com o crescimento do uso de glicocorticoides nos tempos de pandemia e a incapacidade de retirá-los das matrizes aquáticas por tratamento sanitário convencional, cresce a necessidade de monitorá-los e novas tecnologias de baixo custo e fácil operacionalização devem ser pesquisadas e incentivadas.

REFERÊNCIAS¹

- 1 Montagner CC, Vidala C, Acayaba RD. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. *Quim Nova* [Internet]. 2017 [citado 20 fev. 2020];40(9):1094-1110. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v40n9/0100-4042-qn-40-09-1094.pdf>.
- 2 United States Environmental Protection Agency. Endocrine Disruption [Internet]. 2020 [citado 27 fev. 2020]. Disponível em: <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/what-endocrine-disruption>.
- 3 Birkett JW, Lester JN. *Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Process*. Boca Raton: Lewis Publishers; 2003.
- 4 Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek N. 1992. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *British Medical J* [Internet]. 1992 [citado 20 fev. 2020];305(6854): 609-613. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1393072>.
- 5 Bila D, Dezotti M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. *Quím Nova*. 2007 Jun;30(3):651-666. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000300027&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 20 fev. 2020.
- 6 Falqueto E, Kligerman DC. Análise normativa para descarte de resíduos de medicamentos - Estudo de caso da Região Sudeste do Brasil. *Rev direito sanit*. 2012;13(2).
- 7 Paradis-Tanguay L, Camiré A, Renaud M, Chabot B, Lajeunesse A. Sorption capacities of chitosan/polyethylene oxide (PEO) electrospun nanofibers used to remove ibuprofen in water. *J Polym Eng* [Internet]. 2019 [citado 27 fev. 2020];39(3):207-215. Disponível em: <https://www.degruyter.com/view/j/polyeng.2019.39.issue-3/polyeng-2018-0224/polyeng-2018-0224.xml>.
- 8 Carvalho EV, Ferreira E, Mucini L, Santos C. Aspectos legais e toxicológicos do descarte de medicamentos. *Rev Bras Toxicol*. 2009 Dez;22(1-2).

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

- 9 Pinho EAS, Ferreira LFR, Américo-Pinheiro JHP, Torres NH. Tratamento de esgoto sanitário contendo micropoluentes no Brasil: revisão. *Bioenergia em revista: diálogos* [Internet]. 2017 [citado 27 fev. 2020];7(2):46-63. Disponível em: <http://www.fatecpiracicaba.edu.br/revista/index.php/bioenergiaemrevista/article/view/220>
- 10 Fontes H. Substâncias escondidas na água desafiam pesquisadores da USP. Assessoria de Comunicação do IQSC/USP [Internet]. 10 jul. 2019 [citado 14 fev. 2023]. Disponível em: <http://www5.iqsc.usp.br/2019/substancias-escondidas-na-agua-desafiam-pesquisadores-da-usp>.
- 11 Europa conta com primeira instalação para a reutilização direta de água. Portal Tratamento de Água [Internet], São Paulo, 28 out. 2019 [citado 14 fev. 2023]. Disponível em: <https://www.tratamentodeagua.com.br/europa-reutilizacao-direta-agua>.
- 12 Associação Brasileira De Engenharia Sanitária e Ambiental. Situação do saneamento básico no Brasil: uma análise com base na Pnad 2015. Rio de Janeiro; 2016 [citado 14 fev. 2023]. Disponível em: <http://abesdn.org.br/pdf/Situacao.pdf>.
- 13 Acordo setorial busca solução para descarte de medicamentos pela população. Assessoria de Imprensa da Anvisa [Internet], 19 mar 2014 [citado 14 fev. 2023]. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/acordo-setorial-busca-solucao-para-descarte-de-medicamentos-pela-populacao/219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageld=pt_BR.
- 14 Oliveira NR, Lacerda PSB, Kligerman DC, Oliveira JLM. Revisão dos dispositivos legais e normativos internacionais e nacionais sobre gestão de medicamentos. *Ciênc. saúde coletiva*. 2019 Ago;24(8).
- 15 Letsinger S, Kay P, Rodríguez-Mozaz S, Villagrassa M, Barceló D, Rotchell JM. Spatial and temporal occurrence of pharmaceuticals in UK estuaries. *SciTotal Environ* [Internet]. 2019 Aug [citado 20 fev. 2020];15(678):74-84. Disponível em: <https://www.deepdyve.com/lp/elsevier/spatial-and-temporal-occurrence-of-pharmaceuticals-in-uk-estuaries->
- 16 Tran NH, Hoang L, Nghiem LD, Nguyen NMH, Ngo HH, Guo W, Trinh QT, Mai NH, Chen H, Nguyen DD, Ta TT, Gin KY. Occurrence and risk assessment of multiple classes of antibiotics in urban canals and lakes in Hanoi, Vietnam. *Sci Total Environ*. 2019 Nov 20;692:157-174.

- 17 Takashima M. Effects of Thermal Pretreatment and Trace Metal Supplementation on High-Rate Thermophilic Anaerobic Digestion of Municipal Sludge. *J Environ Eng* [Internet]. 2018 Mar [citado 27 fev. 2020];144(3). Disponível em: https://ascelibrary.org/doi/full/10.1061/%28ASCE%29EE.1943-870.0001340?casa_token=_a9k_XvucOMAAAAA%3A6SftQCTfVdEdpE8p_NrEWzdAmalPH52YLRLCNk9ICDI_tsVxLVBiq9jBalZVqNyYZalHtVG-KOii&.
- 18 Jonsson M, Fick J, Klaminder J, Brodin T. 2014. Antihistamines and aquatic insects: Bioconcentration and impacts on behavior in damselfly larvae (Zygoptera). *Sci Total Environ* [Internet]. 2014 [citado 27 fev. 2020];472:108-111. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969713012485>.
- 19 Calderon-Preciado D, Renault Q, Matamoros V, Canameras N, Bayona JM. 2012. Uptake of Organic Emergent Contaminants in Spath and Lettuce: An In Vitro Experiment. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2012 [citado 14 fev. 2023];60(8):2000-2007. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf2046224>.
- 20 Bombardelli RA, Hayashi C. Feminilização de larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) a partir de banhos de imersão com valerato-de-estradiol. *R Bras Zootec*. 2005 Abr;34(2).
- 21 Silveira MAK, Caldas SS, Guilherme JR, Costa FP, Guimarães BS, Cerqueira MBR, Soares BM, Primel EG. Quantification of pharmaceuticals and personal care product residues in surface and drinking water samples by SPE and LC-ESI-MS/MS. *J Braz Chem Soc* [Internet]. 2013 [citado 27 fev. 2020];24(9):1385-1395. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532013000900001.
- 22 Campos HS. Corticoterapia. *Arq Asma Alerg Imunol*. 2018;2(3):324-334.
- 23 García MTC, Rubio LR, Aliaga JLV. *Monografías Farmacéuticas*. Alicante: Colegio Oficial de Farmacéuticos de la Provincia de Alicante; 2002.
- 24 Oliveira TMBF, Pessoa GP, Santos AB, Lima-Neto P, Correia AN. Simultaneous electrochemical sensing of emerging organic contaminants in full-scale sewage treatment plants. *J Chem Eng* [Internet]. 2015 [citado 27 fev. 2020];267:347-354. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894715000212>.

- 25 Leusch FDL, Neale PA, Hebert A, Scheurer M, Schriks MCM. 2017. Analysis of the sensitivity of in vitro bioassays for androgenic, progestagenic, glucocorticoid, thyroid and estrogenic activity: Suitability for drinking and environmental waters. *Enviro Int* [Internet]. 2017 [citado 27 fev. 2020];99:120-130. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412016310261>.
- 26 Daley-Yates PT. Inhaled corticosteroids: potency, dose equivalence and therapeutic index. *Br J Clin Pharmacol*. 2015;80(3):372-80.
- 27 Rhen T, Cidlowski JA., Antiinflammatory action of glucocorticoids – new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med*. 2005;353(16):1711.
- 28 Liu D, Ahmet A, Ward L, Krishnamoorthy P, Mandelcon ED, Leigh R, et al. A practical guide to the monitoring and management of the complications of systemic corticosteroid therapy. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2013;9:30.
- 29 Ferner <https://oxfordbrazilebm.com/index.php/dexametasona/>(Ferner,R E, 2020)
- 30 Donatti TD, Koch V, Takayama L, Pereira RMR. Glicocorticoides: crescimento e mineralização óssea. *J Pediatr*. 2011;87(1):4-12.
- 31 Xu S, Guo R, Li P-Z, Li K, Yan Y, Chen J, Wang G, Brand-Saberi B, Yang X, Cheng X. Dexamethasone interferes with osteoblasts formation during osteogenesis through altering IGF-1-mediated angiogenesis. *J Cell Physiol*. 2019 Sep;234(9):15167-15181.
- 32 Cheng X, Li H, Yan Y, Wang G, Berman Z, Chuai M, Yang X. Usage of Dexamethasone Increases the Risk of Cranial Neural Crest Dysplasia in the Chick Embryo *Toxicol Sci*:2017;158(1):3-47 Disponível em: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx073>
- 33 Osorio V, Larrañaga A, Acenã J, Pérez S, Barceló D. Concentration and risk of pharmaceuticals in Freshwater Systems are related to the population density and livestock units in Iberian Rivers. *Sci Total Environ* [Internet]. 2016 [citado 20 fev. 2020];540:267-277. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26170112>.
- 34 Madikizela LM, Tavengwa NT, Chimuka L. 2017. Status of pharmaceuticals in African Water bodies: occurrence, removal and analytical methods. *J of Environ Manage* [Internet]. 2017 [citado 20 fev. 2020];193:211-220. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28222352>.

- 35 Subedi B, Balakrishna K, Ian Joshua DI, Kannan K. Mass loading and removal of pharmaceutical and personal care products including psychoactives, antihypertensives, and antibiotics in two sewage treatment plants in Southern India. *Chemosphere* [Internet], 2017 [citado 27 fev. 2020];167:429-347. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27750166>.
- 36 Leung HW, Jin L, Wei S, Tsui MMP, Zhou B, Jiao L, Cheung PC, Chun YK, Murphy MB, Lam PKS. Pharmaceuticals in Tap Water: Human Health Risk Assessment and Proposed Monitoring Framework in China. *Environ Health Perspect* [Internet]. 2013 Jul [citado 20 fev. 2020];121(7):839-846. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3702003/>.
- 37 Pereira CDS, Maranhão LA, Cortez FS, Pusceddu FH, Santos AR, Ribeiro DA, Cesar A, Guimarães LL. 2016. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. *Sci Total Environ* [Internet]. 2016 Apr [citado 16 nov. 2017];548-549:148-154, Apr. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969716300511>.
- 38 Been F, Pronk T, Louisse J, Houtman C, Velden-Slootweg T, Oost R, Dingemans MML. Development of a framework to derive effect-based trigger values to interpret CALUX data for drinking water quality. *Water Research* [Internet]. 2021 [citado 17 fev. 2023];193:116859. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135421000579>.
- 39 Brand W, De Jongh C, Van Der Linden S, Mennes W, Puijker L, Van Leeuwen C, Van Wezel, A, Schriks M, Heringa, M. Trigger values for investigation of hormonal activity in drinking water and its sources using CALUX bioassays. *Environ Int* [Internet]. 2013 May [citado 14 fev. 2023]; 55:109-118. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23542573>.
- 40 Godoy AA. Avaliação da ecotoxicidade individual e das misturas de fármacos de preocupação ambiental usando organismos-teste aquáticos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2019 [citado 27 fev. 2020]. Disponível em: https://teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9143/tde-09082019122620/publico/Aline_Andrade_Godoy_DO_Corrigida.pdf.
- 41 Cetesb inicia monitoramento de compostos anti-inflamatórios na água. Cetesb – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo [Internet]. 12 jun 2018 [citado 14 fev. 2023]. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/blog/2018/06/12/cetesb-inicia-monitoramento-de-compostos-anti-inflamatorios-na-agua>.

- 42 Routledge, E. J., Sumpter, J. P., 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ Toxicol Chem*, v. 15, n. 3, p. 241-248, 1996).
- 43 Gomes G, et al. VI-194-Avaliação da atividade estrogênica de substâncias simples e misturas pelo ensaio YES (Yeast Estrogen Screen).
- 44 Dos Santos Azevedo T, De Oliveira Pereira R, Bottrel SEC. Remoção da atividade estrogênica através da cloração: Problemas na implementação do Ensaio YES [trabalho de conclusão de curso]. Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora.
- 45 Dias AC, Gomes FW, Bila DM, Sant'Anna GL Jr, Dezotti M. Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2015 Oct;120:41-7.
- 46 Sanseverino J, Gupta RK, Layton AC, Patterson SS, Ripp SA, Saidak L, Simpson ML, Schultz TW, Saylor GS. Use of *Saccharomyces cerevisiae* BLYES Expressing Bacterial Bioluminescence for Rapid, Sensitive Detection of Estrogenic Compounds. *Appl Environ Microbiol*. 2005 Aug;71(8):4455-60.
- 47 Bergamasco AMD, Eldridge M, Sanseverino J, Sodr  FF, Montagner CC, Pescara IC, Jardim WF, Umbuzeiro GA. Bioluminescent yeast estrogen assay (BLYES) as a sensitive tool to monitor surface and drinkingwater for estrogenicity. *J Environ Monit*. 2011;13:3288-3293.
- 48 De Jong LAA, Uges DRA, Franke JP, Bischoff R. Receptor–ligand binding assays: Technologies and Applications. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005 Dec;829(1-2):1-25.
- 49 Liu Z, Ito M, Kanjo Y, Yamamoto A. Profile and removal of endocrine disrupting chemicals by using an ER/AR competitive ligand binding assay and chemical Analyses. *J Environ Sci*. 2009;21(7):900-906.
- 50 Sanchez DCO. Desreguladores endócrinos na indução da vitelogenina em peixes nativos [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas; 2006.

- 51 Chen Q, Jia A, Snyder SA, Gong Z, Lam SH. Glucocorticoid activity detected by in vivo zebrafish assay and in vitro glucocorticoid receptor bioassay at environmental relevant concentrations. *Chemosphere*. 2016 Feb;144:1162-1169.
- 52 Arsand DR, Kümmerer K, Martins AF. Removal of dexamethasone from aqueous solution and hospital wastewater by electrocoagulation, *Sci Total Environ*. 2012;443:351-357.
- 53 Parvez S, Venkataraman C, Suparna M. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of Chemicals. *Environ Int*. 2006;32(2):265-268.
- 54 Ribatti, D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Reprod Toxicol* [Internet]. 2017 Jun [citado 27 fev. 2020];70:97-101. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27832950>.
- 55 Chen L Wang S, Feng Y, Zhang J, Du Y, Zhang J, Van Ongeval C, Ni Y, Li Y. Utilisation of Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as a Model Platform for Imaging-Navigated Biomedical Research. *Cells*. 2021 Feb 22;10(2):463.
- 56 Almeida J, Gomes L, Pontuschka WM. Relatório técnico do projeto PIPE FAPESP Khemia 2016/15413-7. São Paulo: Laboratório de Microrreologia e Fisiologia Molecular do Departamento de Física Geral do Instituto de Física da Universidade de São Paulo; 2019. Relatório técnico.
- 57 Reig M, Mora L, Navarro JL, Toldrá F. A chromatography method for the screening and confirmatory detection of dexamethasone. *Meat Science*. 2006;74:676-680.
58. De La Cruz LT. Quantificação de angiogênese em imagens de membranas corioalantoicas de embrião de galinha [dissertação]. São Paulo:Universidade de São Paulo, Instituto de Matemática e Estatística; 2015.
- 59 Goes Han, Sarafan M, Amaral JB, Almeida JA, Voegels RL, Cruz LT, Thamboo A, Gomes LF, Pezato R. Differential angiogenic induction impacts nasal polyp tissue growth. *Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery (IJOO)*, 2023 in press. IJOO-D-22-00949.

- 60 Felix A, Almeida JA, Gomes LF, Cruz LT. Quantitative analysis of the effect of silver carbonate rich nanoparticles upon angiogenesis and the development of chicken embryos. Apresentado na seção: Medical Physics. Encontro de Outono da Sociedade Brasileira de Física 2020, em 27 de novembro de 2020. Realizado online, 23 a 26 de novembro de 2020.
- 61 Coronel N, Pezato R, Amaral JB, Cruz LT, Bezerra TFP, Gomes LF, Dreyfuss J, Chamon W, Gregorio LC. Structural changes in the extracellular matrix after cross-linking of nasal polyp tissue. *ACTA-Otorhinolaryngologica Italica* (2020) 40:1-9. <https://doi.org/10.14639/0392-100X-N0566>
- 62 Baldavira CM, Gomes LF, Cruz LT, Maria da, Capelozzi VL. In vivo evidence of angiogenesis inhibition by β 2-glycoprotein I subfractions in the chorioallantoic membrane of chicken embryos. *Brazilian J Med Biol Res* (2021) 54(00): e10291, <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X202010291> ISSN 1414-431X. (Como autor de correspondência)
- 63 Hamburger V, Hamilton H. A series of normal stages in the development of chick embryo. *J.Morph.* 1951;88:49-92
- 64 Lazarovici P, Lahiani A, Gincberg G, Haham D, Marcinkiewicz C, Lelkes PI. 2018. Nerve Growth Factor-Induced Angiogenesis: 2. The Quail Chorioallantoic Membrane Assay. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2018 [citado 20 fev. 2020];1727:251-259. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29222787/>.
- 65 Sherman TS. On Connecting Large Vessels to Small The Meaning of Murray's Law. *J Gen. Physiol.* 1981 Oct;78(4):431-53. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29222787/>.
- 6 Zheng X, Shen G, Wang C, Li Y, Dunphy D, Hasan T, Brinker JC, Bao-Lian S. 6 Apr 2017 Bio-inspired Murray materials for mass transfer and activity. *Nature communications.* 2017;8:14921.

ANEXO A - Produto Educacional

MONICA RIBAS

ODS 6 da ONU é uma questão de saúde: Desafio global a ser enfrentado com empenho interprofissional e políticas públicas

Produto educacional apresentado ao Programa de Mestrado Profissional Interunidades Formação Interdisciplinar em Saúde, da Faculdade de Odontologia, Faculdade de Saúde Pública, Escola de Enfermagem e Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora Profa. Dra. Ligia Ferreira Gomes



CC-BY-NC-AS: esta licença permite que outros remixem, adaptem e criem apartir do seu trabalho para fins não comerciais, desde que atribuam o devido crédito e que licenciem as novas criações sob termos idênticos.

São Paulo

2023

PRODUTO EDUCACIONAL

RESUMO

Contaminantes emergentes são micropoluentes de origem química que têm sido detectados nas águas de superfície, numa mistura complexa, em concentrações da ordem de micro a nanogramas por litro. Nesta denominação estão incluídas diversas classes de substâncias, tais como: fármacos; compostos usados em produtos de higiene pessoal (como protetores solares); hormônios, alquilfenóis e seus derivados; drogas ilícitas; sucralose e outros adoçantes artificiais; pesticidas; subprodutos de transformação físico-química provenientes de processos de desinfecção de águas (DBP, do inglês Disinfection Byproducts); retardantes de chama bromados; compostos perfluorados; siloxanos; benzotriazóis; ácidos naftênicos; percloratos; dioxinas; nanomateriais; líquidos iônicos e microplásticos. Além desses, alguns microrganismos e toxinas de algas também são considerados contaminantes emergentes (Montagner et al., 2017). Pertencente ao grupo dos contaminantes emergentes, um subgrupo de maior preocupação é representado pelos interferentes endócrinos que, segundo a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA), inclui qualquer “agente exógeno capaz de interferir na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação dos hormônios naturais no corpo que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento” (United States Environmental Protection Agency, 2020). Estes resíduos impactam negativamente o meio ambiente, causando efeitos tóxicos sobre a biodiversidade aquática e são considerados, pela sua toxicidade, um risco potencial à saúde pública. Na atualidade, a resposta das sociedades a esta demanda tem sido o monitoramento ambiental em águas de superfície, visto que o tratamento sanitário convencional não consegue retirá-los eficientemente dos recursos hídricos. As amostras ambientais utilizadas no monitoramento apresentam alta complexidade. O monitoramento exige processos tecnológicos químico-analíticos de alta sensibilidade devido às baixas concentrações a serem monitoradas e a avaliação da toxicidade à saúde humana e animal requer análises complementares por testes *in vitro* e *in vivo* (CETESB).

Palavras chave: Emergentes contaminantes, interferentes endócrinos, monitoramento ambiental, ecotoxicidade, toxicidade humana, saúde pública e bioindicadores ambientais DECS:

- [Poluição Química da Água \[SP4.606.806.560.511\]](#);
- [Efeitos da Contaminação da Água \[SP4.606.806.560.355\]](#);
- [Desenvolvimento Sustentável \[N06.230.080.900\]](#)
- [Recursos Hídricos \[N06.230.350.500\]](#)
- [Monitoramento da Água \[VS4.001.001.002\]](#)
- [Gerenciamento de Resíduos \[VS4.001.001.005\]](#)

INTRODUÇÃO

Desde o início do movimento ambientalista, com a publicação do livro “Primavera Silenciosa” de Rachel Carlsen, na década de 60, vários pesquisadores têm se voltado para o problema da contaminação da água.

Porém existe uma grande dificuldade na criação de espaços para divulgação do tema, até em meios acadêmicos, que sejam direcionados aos profissionais de saúde, embora a pureza química da água já seja assunto contemplado na ODS 6 da ONU de 2015.

A divulgação do conhecimento é a primeira etapa para sensibilização destes profissionais, primordial para que se apropriem da situação atual sobre este problema, para que possam discuti-lo e construir meios para combatê-lo ou remediá-lo.

Compartilhamos da ideia que o tema deva ser incluso na educação permanente para profissionais de saúde e ganhar espaço nos meios acadêmicos, em equipamentos públicos de saúde, serviços de vigilância em saúde, órgãos representativos de classe de trabalhadores de saúde e órgãos de regulação.

Desta forma, recebendo o convite da Faculdade de Ciências Farmacêuticas para o ciclo de palestras do programa Fisiopatologia e Toxicologia na semana do dia 18/07/2022 ao dia 22/07/2022, voltado a alunos de graduação e pós graduação, inscrevi uma palestra sobre o tema.

A palestra foi aceita e exibida no dia 22/07/2022, no formato on line, e tinha como título: **“ODS 6 da ONU é uma questão de saúde: Desafio global a ser enfrentado com empenho interprofissional e políticas públicas”**. Nesta apresentação, foi discutido o tema dos contaminantes emergentes e apresentado o nosso trabalho de mestrado, um projeto de adaptação do modelo de membrana

corioalantóica (CAM) para monitoramento de substâncias com atividade glicocorticoide (um interferente endócrino) nas águas de superfície. O evento resultou num vídeo exibido pelo You tube com acesso ao público, mediante inscrição, mantido na plataforma por dois dias, para divulgação. Após este prazo, o vídeo foi retirado da plataforma com a justificativa de garantir os direitos autorais dos participantes, que apresentaram dados inéditos, não publicados.

O evento contou com abertura para questionamentos e discussão e o público alvo se mostrou motivado pelo tema. A técnica e os princípios do bioensaio utilizando o modelo da CAM foram apresentados aos alunos e convidados do programa e os pesquisadores do grupo de bioensaios e fisiologia em multiescala do Laboratório de Microrreologia e Fisiologia Molecular (LabM²) se dispuseram a fornecer um treinamento da técnica “in loco” aos interessados. Após a discussão, que trouxe perguntas interessantes e a divulgação do contato do grupo, agradecemos a oportunidade deste espaço de divulgação.

Justificativa

Os profissionais farmacêuticos são um público alvo importante para a divulgação desse produto educacional, porque os resíduos farmacêuticos, que constituem o escopo do trabalho desenvolvido, são a principal fonte de contaminantes emergentes nas águas residuais, atualmente. Através desses profissionais, toda a cadeia do medicamento pode ser impactada com ações positivas e informações adequadas. E essa informação não esteve inserida na formação profissional dos atuais pós-graduandos, embora participe dos alertas da Organização Mundial da Saúde e dos Objetivos para o Desenvolvimento Sustentável da Organização das Nações Unidas, desde 2015.

O problema dos contaminantes emergentes, resultantes essencialmente da atividade antrópica, é um problema de relevância mundial. (LEUTSINGER, OSORORIO, SUBEDI). No caso dos resíduos farmacêuticos, as fontes de contaminação ambiental podem ser classificadas como evitáveis e não evitáveis.

As contaminações evitáveis podem ser minimizadas pelo uso racional de medicamentos, educação permanente dos profissionais da saúde e da população sobre o descarte adequado, implementação da logística reversa para os

medicamentos, legislação sobre o despejo de contaminantes nas matrizes aquáticas para fontes poluidoras (indústrias, hospitais e outros serviços de saúde) e fiscalização do poder público com a participação da sociedade.

Já as contaminações inevitáveis são representadas pelos produtos de metabolização de medicamentos excretados através do banho (Medicamentos tópicos), da urina e das fezes dos indivíduos que utilizam essas substâncias.

É necessário monitorar esses contaminantes nas matrizes aquáticas, principalmente as substâncias que fazem parte da classe de interferentes endócrinos, para que não exerçam efeitos deletérios a vida aquática e a saúde pública.

A procura de bioindicadores que possam sinalizar o risco tanto para biota quanto a saúde humana, bem como a tecnologia capaz de detectar as menores concentrações que ainda são capazes de desencadear efeitos tóxicos (concentrações “gatilho”) vêm sendo um grande desafio para os pesquisadores das ciências ambientais e uma lacuna técnica a ser preenchida.

Os bio indicadores, para serem úteis, devem ser sensíveis às concentrações reais das amostras ambientais, preferencialmente. Uma sensibilidade adequada evita procedimentos de concentração de amostras ambientais, durante a análise. Procedimentos que podem causar a formação de outros compostos e tornar mais oneroso e difícil o monitoramento.

Estas questões ao serem consideradas e discutidas com profissionais envolvidos com o desenvolvimento de tecnologia para análises toxicológicas, ampliam a percepção do problema e convocam colaborações interprofissionais.

Objetivos

Discutir as limitações para o controle ambiental da poluição química da água por glicocorticóides, considerando a tecnologia existente para a detecção desses compostos em águas de superfície

Discutir a aplicação do bioensaio de angiogênese e teratogênese ao estudo de amostras ambientais de águas de superfície.

Ampliar a discussão sobre os riscos à Saúde Pública e à preservação dos ecossistemas, associados à poluição química da água, envolvendo estudantes de

graduação e pós-graduação, com finalidade de educação permanente alinhada aos objetivos do desenvolvimento sustentável.

Construção e apresentação da Palestra

A palestra usou como material de apoio o template fornecido pelo programa do evento da Fisiotox na construção de um Powerpoint de trinta minutos, reservando mais dez minutos para perguntas e discussão com os participantes. O programa solicitou que os diferentes grupos apresentassem seus projetos na forma de um seminário de pesquisa, que pudesse ainda ser motivador para novos ingressantes.

A palestra foi transmitida através do canal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas no Youtube, nos horários agendados pela organização. Foi selecionada para fechar o evento, das 19:10- 19:50.

A empresa organizadora contratada pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas para o evento foi a Eventbrite, a qual utilizou a plataforma stream yard para transmissões ao vivo.

O conteúdo dos slides foi distribuído nos seguintes blocos:

Slide 1 a 5 : Como o objeto de pesquisa está alinhado as ODS da ONU

Slides 2 a 9 ; O problema dos contaminantes emergentes, sua ecotoxicidade e toxicidade para a saúde pública

Slides 10 a 14: Boa governança de água e políticas públicas

Slides 15 a 16 : monitoramento ambiental

Slides 17 a 22; substância escolhida para monitoramento ambiental, desenho experimental do modelo de pesquisa de bioindicadores e considerações finais sobre o experimento

Slides 23 a 29 : Bibliografia

Slide 30 : Apresentação do nosso grupo de trabalho e do laboratório

A Eventbrite forneceu a cada palestrante um link de acesso permanente ao material de divulgação do evento:

<https://www.event3.com.br/FISIOTOX2022>

Onde é possível rever todos dados do evento, exceto o vídeo das apresentações, por motivos já explicitados.

Considerações Finais

Espaços de educação permanente são de suma importância, tanto para divulgação de trabalhos quanto de aperfeiçoamento na área de saúde.

Na área ambiental, onde trabalhamos cotidianamente com equipe interdisciplinar a interação entre pessoas, o saber compartilhado e o esforço de equipe pode representar a diferença entre um trabalho eficaz e ineficaz. (Thiesen, 2008)

Por isto a necessidade de compartilhar, além do conhecimento sobre os temas em pesquisa e desenvolvimento, a percepção sobre o papel de cada um na equipe e a construção de uma forma dialógica para uma solução comum.

A forma como foi configurada a palestra/aula para alunos de graduação e pós-graduação, com finalidade de educação permanente, pode ser apresentada como material de apoio para outros espaços como seminários para grupos de assistência do SUS, discussões em rodas de conversa para alunos de graduação, palestras em conselhos de classe com foco em gerenciamento de resíduos, discussões sobre o tema em fóruns de organizações não governamentais, grupos de trabalho em espaços de vigilância em saúde e em eventos de educação permanente.

Segue abaixo o certificado do evento:



PROGRAMAÇÃO

Ciclo de Palestras - IV Escola de Inverno em Fisiopatologia e Toxicologia – Fisiotox 2022

18/07/22

Envelhecimento do Sistema Hematopoético
Química e Toxicologia Forense: da droga ao sangue
Cordão umbilical, cabelo e outras alternativas para análises Toxicológicas
Como peptídeos podem auxiliar no tratamento de doenças metabólicas?

19/07/22

A compreensão da síndrome do desconforto respiratório aguda associado à malária: para que serve?
Pesquisas com uma nova proteína quimérica promissora para vacina contra Malária
Biologia do câncer
Câncer: heterogeneidade, metástase e resistência
Tratamento do câncer: do clássico ao alvo-dirigido

20/07/22

Metabolômica como ferramenta para desreplicação de cianotoxinas em amostras ambientais
A ação hormonal do Colecalciferol (Vitamina D3) sobre o sistema imune.
Características fisio-toxicológicas dos ácidos graxos trans presentes nos alimentos
Microbioma durante a gestação
Microbioma nos primeiros dias de vida

21/07/22

Perícia Criminal: Por dentro do Núcleo de Exames de Entorpecentes
Microbioma na primeira infância e neurodesenvolvimento
Imunotoxicidade de novos produtos de tabaco: novos gatilhos para doenças inflamatórias crônicas?
As diferentes faces da Anexina A1
Conceitos Básicos em Citometria de Fluxo

22/07/22

Impacto estrutural das variantes missense de PCSK9 em pacientes com Hipercolesterolemia Familiar
Aplicações de Visão Computacional para a Área da Saúde
O papel dos RNAs longos não-codificadores na resposta imune à vacina de Ebola
Expansão desenfreada das células secretoras de anticorpos em pacientes infectados com Dengue
ODS 6 da ONU é uma questão de Saúde: Desafio global a ser enfrentado com empenho interprofissional e políticas públicas.

Referências bibliográficas

- BILA, D.M.; DEZOTTI, M. 2007. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. *Quím Nova*, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 651-666, jun. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000300027&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 20 fev. 2020.
- CETESB inicia monitoramento de compostos anti-inflamatórios na água. 2018. Cetesb – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, São Paulo, 12 jun. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/blog/2018/06/12/cetesb-inicia-monitoramento-de-compostos-anti-inflamatorios-na-agua>. Acesso em: 27 fev. 2020.
- LETSINGER, S.; KAY, P; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; VILLAGRASSA, M.; BARCELÓ, D.; ROTCHELL, J.M. 2019. Spatial and temporal occurrence of pharmaceuticals in UK estuaries. *Science of the Total Environment*, v. 15, n. 678, p. 74-84, Aug. Disponível em: <https://www.deepdyve.com/lp/elsevier/spatial-0-9,3mand-temporal-occurrence-of-pharmaceuticals-in-uk-estuaries->
- MONTAGNER, C.C.; VIDALA, C.; ACAYABA, R.D. 2017. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. *Quim Nova*, v. 40, n. 9, p. 1094-1110. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v40n9/0100-4042-qn-40-09-1094.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2020.
- OSORIO, V.; LARRAÑAGA, A.; ACENÁ, J.; PÉREZ, S.; BARCELÓ, D. 2016. Concentration and risk of pharmaceuticals in Freshwater Systems are related to the population density and livestock units in Iberian Rivers. *Science of the Total Environment*, v. 540, p. 267-277. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26170112>. Acesso em: 20 fev. 2020.
- SUBEDI, B.; BALAKRISHNA, K.; IAN JOSHUA, D.I.; KANNAN, K. 2017. Mass loading and removal of pharmaceutical and personal care products including psychoactives, antihypertensives, and antibiotics in two sewage treatment plants in Southern India. *Chemosphere*, v. 167, p. 429-347. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27750166>. Acesso em: 20 fev. 2020
- THIESEN, Juarez da Silva. 2008. *Rev. Bras. Educ.*, v. 13, n. 39, dez.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2020. Endocrine Disruption. Disponível em: <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/what-endocrine-disruption>. Acesso em: 27 fev. 2020.

ANEXO B - Análise Estatística

Iniciaremos o estudo verificando a normalidade das variáveis para determinar o tipo de teste a ser aplicado, se paramétrico ou não paramétrico. (veja metodologia Estatística)

Para tanto aplicarei teste de Kolmogorov-Smirnov.

	Statistic	df	Sig. (p)
Peso (g)	0,112	70	0,031*
Tamanho (mm)	0,158	70	<0,001*
Pata	0,270	72	<0,001*
Asa	0,202	72	<0,001*
Olho	0,296	72	<0,001*
Bico	0,161	72	<0,001*

Quando o valor de p for menor ou igual a 0,05, dizemos que foi significativa e a variável não adere a Normalidade (curva de Gauss) e usamos testes não paramétricos. Caso Contrário, usamos testes paramétricos. Todos os valores de p foram <0,001*, portanto usaremos testes não paramétricos.

Comparativos entre os grupos de Amostra (controle, DEXA 0.8 ng, DEXA 8 ng, DEXA 20 ng, DEXA 80 ng e veículo) quanto ao estadiamento para PESO. Para tanto usarei teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para identificação nos Resultados usei a seguinte legenda: controle (c), DEXA 0.8 ng (0.8), DEXA 8 ng (8), DEXA 20 ng (20), DEXA 80 ng (8) e veículo (v). As colunas estão em ordem crescente das médias. Peso (g): Teste de Resultado

Grupo	DEXA 80 ng	DEXA 20 ng	DEXA 8 ng	DEXA 0.8 ng	veiculo	controle	Krsukal_wallis (p)	
Média	1,07	1,14	1,18	1,18	1,20	1,26		
Mediana	1,18	1,10	1,14	1,19	1,21	1,17	0,701	(80) = (20) = (8) = (0.8) = (v) =(c)
Desvio-padrão	0,44	0,13	0,33	0,15	0,24	0,16		
n	11	12	14	9	11	15		

Não houve diferenças significantes entre os grupos quanto ao Peso.

Comparativos entre os grupos de Amostra (controle, DEXA 0.8 ng, DEXA 8 ng, DEXA 20 ng, DEXA 80 ng e veículo) quanto ao estadiamento para TAMANHO.

Para tanto usarei teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Para identificação nos Resultados usei a seguinte legenda: controle (c), DEXA 0.8 ng (0.8), DEXA 8 ng (8), DEXA 20 ng (20), DEXA 80 ng (8) e veículo (v).

As colunas estão em ordem crescente das médias.

Tamanho (mm): Teste de Krsukal_wallis

	DEXA 0.8 ng	DEXA 80 ng	controle	DEXA 20 ng	veiculo	DEXA 8 ng	Krsukal_wallis (p)	
Média	20,04	20,70	21,35	21,54	22,23	22,41		
Mediana	21,06	22,27	21,18	21,14	22,19	22,63	0,261	(0.8) = (80) = (c) = (20) = (v) = =(8)
Desvio-padrão	4,15	5,28	1,35	1,29	1,51	1,63		
n	10	11	15	12	11	12		

Não houve diferenças significantes entre os grupos quanto ao Tamanho.

Comparativos entre os grupos de Amostra (controle, DEXA 0.8 ng, DEXA 8 ng, DEXA 20 ng, DEXA 80 ng e veículo) quanto ao estadiamento para PATA.

Para tanto usarei teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com comparações múltiplas de Tukey 2 a 2 para verificar onde estão as diferenças.

Para identificação nos Resultados usei a seguinte legenda: controle (c), DEXA 0.8 ng (0.8), DEXA 8 ng (8), DEXA 20 ng (20), DEXA 80 ng (8) e veículo (v).

As colunas estão em ordem crescente das médias.

Grupo Estágio Pata Teste de Krsukal_wallis

		DEXA 0.8 ng	DEXA 80 ng	DEXA 20 ng	DEXA 8 ng	veículo	controle	Krsukal_wallis (p)	
	Média	31,4	32,5	32,6	33,0	33,3	33,7		
	Mediana	32,0	34,0	32,0	34,0	34,0	34,0	<0,001*	(0.8) < (20) = (8) = (v) =(c)
	Desvio- padrão	2,4	2,0	1,1	1,7	1,1	0,8		
	n	29	30	35	43	39	55		

Comparações múltiplas de Tukey 2 a 2. Estágio Pata

Pata	controle	DEXA 0.8 ng	DEXA 8 ng	DEXA 20 ng	DEXA 80 ng
DEXA 0.8 ng	<0,001*				
DEXA 8 ng	0,162	<0,001*			
DEXA 20 ng	0,325	0,024*	0,911		
DEXA 80 ng	0,341	0,081	0,765	0,999	
veículo	0,751	<0,001*	0,941	0,268	0,268

A tabela mostra cada teste 2 a 2 entre todos os grupos e a leitura de cada comparativo se fazer pelos cruzamentos entre linha e coluna.

Por exemplo, entre DEXA 0.8 ng e controle foi ($<0,001^*$) e entre DEXA 8 ng e controle foi (0,162). Assim por diante.

Os comparativos destacados em amarelo foram os significantes ($p < 0,05$).

Através desses comparativos obtive a hierarquia apresentada na coluna “Resultado” da tabela anterior.

Pela coluna “Resultado” concluímos que o grupo DEXA 0.8 tem em média valores mais baixos que os demais grupos exceto o grupo DEXA 80 ng. Os demais comparativos foram iguais.

Comparativos entre os grupos de Amostra (controle, DEXA 0.8 ng, DEXA 8 ng, DEXA 20 ng, DEXA 80 ng e veículo) quanto ao estadiamento para ASA.

Para tanto usarei teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com comparações múltiplas de Tukey 2 a 2 para verificar onde estão as diferenças.

Para identificação nos Resultados usei a seguinte legenda: controle (c), DEXA 0.8 ng (0.8), DEXA 8 ng (8), DEXA 20 ng (20), DEXA 80 ng (8) e veículo (v).

As colunas estão em ordem crescente das médias.

Grupo Estágio Asa Teste de Krsukal_wallis

	DEXA 0.8 ng	DEXA 80 ng	DEXA 20 ng	DEXA 8 ng	veículo	controle	Krsukal_wallis (p)	
Média	31,7	32,5	32,6	33,0	33,3	33,5		
Mediana	32,0	33,0	33,0	34,0	34,0	34,0	$<0,001^*$	(0.8) < (20) = (8) = (v) =(c)
Desvio- padrão	2,0	1,8	0,8	1,5	1,1	0,9		
n	36	40	43	58	43	63		

Comparações múltiplas de Tukey 2 a 2.

Asa	controle	DEXA 0.8 ng	DEXA 8 ng	DEXA 20 ng	DEXA 80 ng
DEXA 0.8 ng	<0,001*				
DEXA 8 ng	0,295	<0,001*			
DEXA 20 ng	0,274	0,045*	0,787		
DEXA 80 ng	0,280	0,141	0,517	0,998	
veículo	0,983	<0,001*	0,832	0,074	0,074

A tabela mostra cada teste 2 a 2 entre todos os grupos e a leitura de cada comparativo se fazer pelos cruzamentos entre linha e coluna.

Por exemplo, entre DEXA 0.8 ng e controle foi (<0,001*) e entre DEXA 8 ng e controle foi (0,295). Assim por diante.

Os comparativos destacados em amarelo foram os significantes ($p < 0,05$).

Através desses comparativos obtive a hierarquia apresentada na coluna "Resultado" da tabela anterior.

Pela coluna "Resultado" concluímos que o grupo Dexa 0.8 tem em média valores mais baixos que os demais grupos exceto o grupo DEXA 80 ng. Os demais comparativos foram iguais.

Comparativos entre os grupos de Amostra (controle, DEXA 0.8 ng, DEXA 8 ng, DEXA 20 ng, DEXA 80 ng e veículo) quanto ao estadiamento para OLHO.

Para tanto usarei teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com comparações múltiplas de Tukey 2 a 2 para verificar onde estão as diferenças.

Para identificação nos Resultados usei a seguinte legenda: controle (c), DEXA 0.8 ng (0.8), DEXA 8 ng (8), DEXA 20 ng (20), DEXA 80 ng (8) e veículo (v).

As colunas estão em ordem crescente das médias.

Grupo Estágio Olho Teste de Krsukal_wallis

	DEXA 0.8 ng	DEXA 8 ng	DEXA 20 ng	DEXA 80 ng	controle	veículo	Krsukal_wallis (p)	
Média	32,3	33,0	33,4	33,5	34,0	34,2		(0.8) < (80) = (v) =(c)
Mediana	32,0	34,0	34,0	34,0	34,0	34,0	<0,001*	(0.8) = (8) = (20)
Desvio- padrão	1,8	1,9	1,7	2,2	1,2	0,9		(8) < (v) =(c)
n	32	43	33	38	58	34		

Comparações múltiplas de Tukey 2 a 2.

Olho	controle	DEXA 0.8 ng	DEXA 8 ng	DEXA 20 ng	DEXA 80 ng
DEXA 0.8 ng	<0,001*				
DEXA 8 ng	0,020*	0,512			
DEXA 20 ng	0,362	0,079	0,862		
DEXA 80 ng	0,347	0,030*	0,679	1,000	
veículo	0,990	<0,001*	0,012*	0,421	0,421

A tabela mostra cada teste 2 a 2 entre todos os grupos e a leitura de cada comparativo se faz pelos cruzamentos entre linha e coluna.

Por exemplo, entre DEXA 0.8 ng e controle foi (<0,001*) e entre DEXA 8 ng e controle foi (0,020*). Assim por diante.

Os comparativos destacados em amarelo foram os significantes ($p < 0,05$).

Através desses comparativos obtive a hierarquia apresentada na coluna "Resultado" da tabela anterior.

Pela coluna “Resultado” concluímos que o grupo DEXA 0.8 tem em média valores mais baixos que os demais grupos exceto o grupo DEXA 8 ng e DEXA 20 ng. E o grupo DEXA 8 ng tem em média valores mais baixos que os grupos veículo e controle. Os demais comparativos foram iguais.

Comparativos entre os grupos de Amostra (controle, DEXA 0.8 ng, DEXA 8 ng, DEXA 20 ng, DEXA 80 ng e veículo) quanto ao estadiamento para BICO.

Para tanto usarei teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com comparações múltiplas de Tukey 2 a 2 para verificar onde estão as diferenças.

Para identificação nos Resultados usei a seguinte legenda: controle (c), DEXA 0.8 ng (0.8), DEXA 8 ng (8), DEXA 20 ng (20), DEXA 80 ng (8) e veículo (v).

As colunas estão em ordem crescente das médias.

Grupo estágio Bico Teste de Krsukal_wallis

	DEXA 0.8 ng	DEXA 20 ng	DEXA 8 ng	DEXA 80 ng	veículo	controle	Krsukal_wallis (p)	
Média	31,6	32,8	33,0	33,2	33,3	33,7		
Mediana	32,0	33,0	33,0	34,0	33,0	34,0	<0,001*	(0.8) < (20) = (8) = (80) = (v) =(c)
Desvio- padrão	1,2	1,1	1,4	1,6	1,3	0,9		
n	24	33	42	33	33	46		

Comparações múltiplas de Tukey 2 a 2.

Bico	controle	DEXA 0.8 ng	DEXA 8 ng	DEXA 20 ng	DEXA 80 ng
DEXA 0.8 ng	<0,001*				
DEXA 8 ng	0,047*	<0,001*			
DEXA 20 ng	0,282	0,0068	0,984		
DEXA 80 ng	0,282	<0,001*	0,967	0,730	
veículo	0,614	<0,001*	0,875	1,000	1,000

A tabela mostra cada teste 2 a 2 entre todos os grupos e a leitura de cada comparativo se faz pelos cruzamentos entre linha e coluna.

Por exemplo, entre DEXA 0.8 ng e controle foi ($<0,001^*$) e entre DEXA 8 ng e controle foi ($0,047^*$). Assim por diante.

Os comparativos destacados em amarelo foram os significantes ($p<0,05$).

Através desses comparativos obtive a hierarquia apresentada na coluna “Resultado” da tabela anterior.

Pela coluna “Resultado” concluímos que o grupo DEXA 0.8 tem em média valores mais baixos que os demais grupos. Os demais comparativos foram iguais.

Metodologia Estatística

O teste de Normalidade é feito para verificar se uma determinada variável está adequada a distribuição de dados da curva Normal (de Gauss). Esse teste auxilia a escolha do teste a ser usado, pois temos testes paramétricos (sobre dados que seguem a curva da Normal) e testes não paramétricos (sobre dados que não seguem a curva da Normal).

Temos dois testes básicos de normalidade: Shapiro-Wilk, indicado para amostras pequenas de até 30 casos e Kolmogorov-Smirnov para amostras maiores que 30 casos.

O teste de Kruskal-wallis é um teste não paramétrico e é indicado quando se quer comparar 3 ou mais grupos de informações quantitativas de amostras independentes e não se deseja assumir suposições acerca da distribuição das amostras analisadas.

TESTES DE COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS. Os testes de comparações múltiplas, também conhecidos como testes de comparações de médias, servem como um complemento ao teste F da análise de variância ou ao teste de Kruskal-Wallis quando este é significativo e são usados para detectar diferença entre médias.

Referência Bibliográfica

Livro: Primer of Biostatistics

Autor: Glantz, Stanton A.2011

Editora Mc Graw Hill 7ª edição - USA

ANEXO C – Certificado do Comitê de Ética para o Uso de Animais



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA



CEUA/FCF 041.2020-P616

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação do risco biológico por contaminantes emergentes em águas superficiais da cidade de São Paulo utilizando como modelo experimental a membrana coriolantoica de embrião de galinha**” registrada com o nº **616**, sob a responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Profa Lígia Ferreira Gomes**, que envolve produção ou manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto Federal nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e das normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), em reunião de **19 de junho de 2020**.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/07/2020 a 31/08/2020
Espécie/linhagem/raça	Gallus domesticus / Lohmann ou Legom
Número de animais	222
Sexo	Ovo embrionado
Peso/Idade	60g
Origem	IOUSP
Total de animais	222

Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento do projeto de pesquisa, o respectivo **relatório final**.

Ressaltamos que após o período de término do projeto de pesquisa, nenhum ensaio poderá ser realizado.

São Paulo, 01 de julho de 2020.

Profa. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto
Coordenadora CEUA/FCF/USP

ANEXO D – Planilha de dados dos embriões incluídos na análise

n° ovo	Grupo	Amostra individual	Peso (g)	Tamanho (mm)	Pata (estágio)	Asa (estágio)	Olho (estágio)	Bico (estágio)
1	controle	20200811_Controle 1	1,1181	18,98	34	32	34,5	32,5
2	controle	20200811_Controle 2	1,2855	24,61	34	35	35	35
3	controle	20200811_Controle 3	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
4	controle	20200811_Controle 4	1,3657	21,44	33	33	35	33,5
25	controle	20210214_Controle 1	1,4769	20,60	34	34	35	35
26	controle	20210214_Controle 2	1,1731	19,45	34	34	34	34
27	controle	20210214_Controle 3	1,2486	21,18	34	34	35	34
28	controle	20210214_Controle 4	1,4875	21,27	35	35	35	35
97	controle	20210520_Controle 1	1,3477	22,87	34	33,5	34	33
98	controle	20210520_Controle 2	1,1104	21,03	32	32	34	32
99	controle	20210520_Controle 3	1,146	21,11	34	34	34	33
100	controle	20210520_Controle 4	1,1677	21,33	34	34	34	34
121	controle	20210704_Controle 1	1,1256	22,66	32	32	31	32
122	controle	20210704_Controle 2	1,5963	21,97	34	34	33	34
123	controle	20210704_Controle 3	1,0847	20,59	34	33	34	33
124	controle	20210704_Controle 4	1,1112	21,11	34	33,5	33	34
9	Dexa 0,8 ng	20200811_Dexa 0,8ng 1	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
10	Dexa 0,8 ng	20200811_Dexa 0,8ng 2	1,3287	24,45	27	28	31	32
11	Dexa 0,8 ng	20200811_Dexa 0,8ng 3	1,2737	22,62	33	34	35	33
12	Dexa 0,8 ng	20200811_Dexa 0,8ng 4	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.

n° ovo	Grupo	Amostra individual	Peso (g)	Tamanho (mm)	Pata (estágio)	Asa (estágio)	Olho (estágio)	Bico (estágio)
33	Dexa 0,8 ng	20210214_Dexa 0,8ng 1	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.
34	Dexa 0,8 ng	20210214_Dexa 0,8ng 2	1,1528	17,67	34	33	34	33
35	Dexa 0,8 ng	20210214_Dexa 0,8ng 3	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.
36	Dexa 0,8 ng	20210214_Dexa 0,8ng 4	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.
105	Dexa 0,8 ng	20210520_Dexa 0,8 ng 1	1,2866	20,15	34	34	34	32
106	Dexa 0,8 ng	20210520_Dexa 0,8 ng 2	1,1927	21,8	34	34	34	32
107	Dexa 0,8 ng	20210520_Dexa 0,8 ng 3	N.d.	9,68	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
108	Dexa 0,8 ng	20210520_Dexa 0,8 ng 4	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
129	Dexa 0,8 ng	20210704_Dexa 0,8 ng 1	1,3376	23,1	31,5	31	31,5	31,5
130	Dexa 0,8 ng	20210704_Dexa 0,8 ng 2	0,8835	18,76	30	30	30	30
131	Dexa 0,8 ng	20210704_Dexa 0,8 ng 3	1,0875	21,09	31	31	32	32
132	Dexa 0,8 ng	20210704_Dexa 0,8 ng 4	1,073	21,03	30	30	30	30
13	Dexa 8 ng	20200811_Dexa 8ng 1	0,412	-	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
14	Dexa 8 ng	20200811_Dexa 8ng 2	1,5	25,33	31	31	32,5	32
15	Dexa 8 ng	20200811_Dexa 8ng 3	1,66	23,34	30	31	32,5	32
16	Dexa 8 ng	20200811_Dexa 8 ng 4	1,4756	Perda	35	35	35	35
37	Dexa 8 ng	20210214_Dexa 8ng 1	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.
38	Dexa 8 ng	20210214_Dexa 8ng 2	1,0803	21,88	34	34	34	34
39	Dexa 8 ng	20210214_Dexa 8ng 3	1,424	22,83	34	33,5	34	33,5
40	Dexa 8 ng	20210214_Dexa 8ng 4	1,4311	22,13	33,5	34	35	35
109	Dexa 8 ng	20210520_Dexa 8 ng 1	0,9652	22,98	34	33	-	33
110	Dexa 8 ng	20210520_Dexa 8 ng 2	1,1895	22,83	34	34	33,5	34

n° ovo	Grupo	Amostra individual	Peso (g)	Tamanho (mm)	Pata (estágio)	Asa (estágio)	Olho (estágio)	Bico (estágio)
111	Dexa 8 ng	20210520_Dexa 8 ng 3	1,0915	22,02	34	34	34	34
112	Dexa 8 ng	20210520_Dexa 8 ng 4	1,3805	23,96	34	34	35	34
133	Dexa 8 ng	20210704_Dexa 8 ng 1	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
134	Dexa 8 ng	20210704_Dexa 8 ng 2	1,0133	22,43	30	30	30	32
135	Dexa 8 ng	20210704_Dexa 8 ng 3	0,9888	20,14	34	33	34	33
136	Dexa 8 ng	20210704_Dexa 8 ng 4	0,8548	19,06	31	31	31	31
17	Dexa 20 ng	20200811_Dexa 20 ng 1	1,1678	20,42	33	33	35	35
18	Dexa 20 ng	20200811_Dexa 20 ng 2	1,2507	22,14	33	33	35	33
19	Dexa 20 ng	20200811_Dexa 20 ng 3	1,0483	21,18	32	32,5	35	32
20	Dexa 20 ng	20200811_Dexa 20 ng 4	quebra	quebra	quebra	quebra	quebra	quebra
41	Dexa 20 ng	20210214_Dexa 20 ng 1	1,4324	24,31	32,5	32	35	32
42	Dexa 20 ng	20210214_Dexa 20ng 2	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.
43	Dexa 20 ng	20210214_Dexa 20ng 3	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.
44	Dexa 20 ng	20210214_Dexa 20ng 4	1,0461	20,45	34	33	34	33
113	Dexa 20 ng	20210520_Dexa 20 ng 1	1,0983	22,39	31,5	31,5	31	33
114	Dexa 20 ng	20210520_Dexa 20 ng 2	1,271	23,36	31	32	31,5	32
115	Dexa 20 ng	20210520_Dexa 20 ng 3	1,1734	20,58	34	34	34	34
137	Dexa 20 ng	20210704_Dexa 20 ng 1	1,092	20,17	34	33	33,5	34
138	Dexa 20 ng	20210704_Dexa 20 ng 2	0,9634	20,75	32	32	32	32
139	Dexa 20 ng	20210704_Dexa 20 ng 3	1,0382	21,1	32	32	32	30
140	Dexa 20 ng	20210704_Dexa 20 ng 4	1,0557	21,64	33,5	33	33	33
21	Dexa 80 ng	20200811_Dexa 80 ng 1	0,0205	6,06	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.

n° ovo	Grupo	Amostra individual	Peso (g)	Tamanho (mm)	Pata (estágio)	Asa (estágio)	Olho (estágio)	Bico (estágio)
22	Dexa 80 ng	20200811_Dexa 80 ng 2	1,4326	25,06	34	34	35	34
23	Dexa 80 ng	20200811_Dexa 80 ng 3	1,5358	20,06	34	33	35	35
24	Dexa 80 ng	20200811_Dexa 80 ng 4	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
45	Dexa 80 ng	20210214_Dexa 80ng 1	1,1827	24,3	31	32	35	33
46	Dexa 80 ng	20210214_Dexa 80ng 2	1,3581	23,45	31	31	35	32
47	Dexa 80 ng	20210214_Dexa 80ng 3	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.
48	Dexa 80 ng	20210214_Dexa 80ng 4	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.
117	Dexa 80 ng	20210520_Dexa 80 ng 1	1,1832	23,83	32	32	32	32
118	Dexa 80 ng	20210520_Dexa 80 ng 2	1,2356	22,3	34	34	34	33
119	Dexa 80 ng	20210520_Dexa 80 ng 3	1,0079	21,25	34	33	34	33,5
120	Dexa 80 ng	20210520_Dexa 80 ng 4	1,1556	21,4	34	34	35	34
141	Dexa 80 ng	20210704_Dexa 80 ng 1	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
142	Dexa 80 ng	20210704_Dexa 80 ng 2	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.
143	Dexa 80 ng	20210704_Dexa 80 ng 3	0,4666	17,75	28	28	28	28
144	Dexa 80 ng	20210704_Dexa 80 ng 4	1,1525	22,27	34	33	33	34
5	veículo	20200811_Veículo 1	1,3787	20,45	34	34	35	34
6	veículo	20200811_Veículo 2	1,4272	24,06	34	35	35	35
7	veículo	20200811_Veículo 3	1,3881	23,9	34	34	35	34
8	veículo	20200811_Veículo 4	1,4037	24,34	33	33	34	33,5
29	veículo	20210214_Veículo 1	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
30	veículo	20210214_Veículo 2	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.
31	veículo	20210214_Veículo 3	1,4508	21,32	34	34	35	34

n° ovo	Grupo	Amostra individual	Peso (g)	Tamanho (mm)	Pata (estágio)	Asa (estágio)	Olho (estágio)	Bico (estágio)
32	veículo	20210214_Veículo 4	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.
101	veículo	20210520_Veículo 1	0,9452	19,72	31	31	34	33
102	veículo	20210520_Veículo 2	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.	N.e.
103	veículo	20210520_Veículo 3	1,1711	22,68	31,5	34	35	30
104	veículo	20210520_Veículo 4	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
125	veículo	20210704_Veículo 1	1,2118	22,89	33	33	33	33
126	veículo	20210704_Veículo 2	0,7214	21,13	32	32	32	-
127	veículo	20210704_Veículo 3	1,1532	21,81	33	33	34	33
128	veículo	20210704_Veículo 4	0,9921	22,19	34	34	34	34

N.d. = Não desenvolvido

N.e.= Não embrionado

- = Não determinado, medida não realizada