

ESTUDO DO PONTENCIAL ECOTOXICOLÓGICO DE INSULINAS E ANÁLOGOS DE INSULINAS, UTILIZANDO ALGAS DO GÊNERO *EUGLENA GRACILIS* PARA BIOTESTES DE TOXICIDADE AQUÁTICA.

PINTO, L.H.¹; BIFF, H.²; DEVEGILI, G.²; SIERTH, R.²; SCHULTER, L.S.²; FAUSTO, M.C.²; SOARES, J.C.²; CIAMPO, L.D.³ & ERZINGER, G.S.⁴

1. Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE.

2. Graduandas do curso de Farmácia da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE.

3. Ecobabitoga Tecnologia Ambiental.

4. Professor do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE.

*Corresponding author: lucianoefar@gmail.com

ABSTRACT

Pinto, L.H.; Biff, H.; Devegili, G.; Sierth, R.; Schulte, L.S.; Fausto, M.C.; Soares, J.C.; Ciampo, L.D. & Erzinger, G.S., 2017. Estudo do potencial ecotoxicológico de insulinas e análogos de insulinas, utilizando algas do gênero *Euglena gracilis* para biotestes de toxicidade aquática. *Braz. J. Aquat. Sci. Technol.* 21(1). eISSN 1983-9057. DOI: 10.14210/bjast.v21n1. The environmental problems reside in large part to the lack of management of generated waste, including waste medications. These are released to the environment without proper treatment, which is often non-existent, a fact that helps to intensify the risks of this type of pollution, and is now called "emerging pollutants". This situation deserves attention mainly on eliminating drugs for chronic diseases of high prevalence and incidence, as in the case of diabetes, a condition with increasing number of users of insulin and analogues patients. This condition causes an increased scale of production, use and disposal of these drugs and the presence in the industrial effluents from industries that produce such medication. METHODS: Samples contaminated with analogs of insulins exposed so contact genus of algae *Euglena gracilis* cultures in order to verify behavioral changes and changes in photosynthetic activity observing the presence of risk of environmental toxicity. RESULTS AND DISCUSSION: The photosynthetic activity was altered, and the glargine insulin analog that most affected this behavior. Studies in new trophic levels can give better dimension of the problem.

Key words: Insulin analogues, Ecotoxicological risk, Pharmaceutical industrial effluents.

INTRODUÇÃO

Atualmente, enfrenta-se sérios desafios com o advento dos poluentes emergentes, sendo esses não responsabilizados pelos danos ambientais observados ou estavam em quantidades ínfimas antigamente, estão agora ganhando repercussão no âmbito ambiental (Lopez-Serna et al., 2012). Tal condição é um tema emergente que desperta a preocupação de órgãos de saúde e meio ambiente e de pesquisadores da área da saúde ambiental.

As legislações ambientais existentes não abordam de forma clara a questão da poluição emergente, sendo por vezes desatualizadas e descontextualizadas. Estas circunstâncias geram conflitos de interpretação e interesses, o que acarreta dúvidas e impossibilita a ação e adoção de práticas eficazes para o melhor gerenciamento de resíduos (Tapia, 2009).

Indústrias farmacêuticas são consideradas como grandes geradoras de resíduos em termos de volume (Verlicchi et al., 2012), porém com crença que são de baixo potencial de risco ambiental pela quanti-

dade pequena em que os ativos se encontram nos recursos hídricos, por exemplo. Entretanto, estudos de Verlicchi et al. (2012) apontam que os medicamentos são uma classe importante de poluição emergente, pois são vários os estudos que demonstram que não se trata apenas da concentração, mas sim o tempo de exposição e a capacidade de bioacumulação como fatores decisivos para manifestação de efeitos a longo prazo (Valcárcel et al., 2011).

Tal condição implicaria em desafios ainda maiores no controle e melhoria dos processos de descarte de resíduos, bem como no conhecimento dos riscos que tais resíduos podem causar, visando à proteção ambiental frente a estes poluidores (Kunkel et al., 2012).

Vale ressaltar que a produção e risco contaminação esta diretamente proporcional a incidência de certas doenças, sendo as mais prevalentes as que mais se consome medicamentos. Entre as doenças crônicas, a diabetes apresenta altos índices na população mundial. No Brasil estima-se que 5,3% da população acima de 18 anos sejam portadores de Diabetes

Mellitus e a prevalência cresce em 11% quando acima dos 40 anos, correspondendo a 6,4 milhões de pessoas (Brasil, 2009). De todos esses casos, 5% são do tipo 1 e, portanto, consomem insulina exógena, o que fica em torno de 320 mil pessoas (Brasil, 2009).

Na tentativa de conseguir um bom controle metabólico, o tratamento com insulina exógena constitui-se uma opção terapêutica eficiente. Com o desenvolvimento da bioengenharia genética passou-se a produzir quimicamente insulinas humanas sintetizadas por técnicas de recombinação de DNA. As primeiras preparações insulínicas corrigiam as desconpenções, mas sua duração era curta, sendo assim era necessário de quatro a cinco injeções diárias para conseguir um bom controle metabólico. Em 1935, com a finalidade de aumentar o tempo de duração da insulina e conseqüentemente diminuir o número de injeções por dia, foram adicionando substâncias tais como soluções oleosas, metais pesados (zinco) e proteínas (protamina) (Souza & Zanetti, 2000).

No final da década de 1990 houve a síntese do análogo de insulina ultrarrápida, denominada lispro, que quimicamente se fundamentou na inversão de posição dos aminoácidos prolina (B28) e lisina (B29) na cadeia β da insulina humana (Pires & Chacra, 2008). Esta alteração trouxe a capacidade de uma absorção mais rápida devido à formação de cristais menos estáveis na presença de zinco. Este metal é responsável pela cristalização de seis porções de insulina em hexâmeros, que posteriormente são desfeitos, deixando a insulina livre para a ação (Hirsch, 2005). Em 2000, outro análogo de insulina chegou ao mercado, desta vez com ação prolongada. Denominada como glargina, este análogo difere quimicamente da insulina humana em três posições de aminoácidos. Na cadeia 21, a asparagina é substituída pela glicina, para aumentar a estabilidade da molécula, e duas moléculas de arginina são acrescentadas na posição B31 e B32. Estas alterações mudam o ponto isoelétrico da insulina, elevando seu pH para o mais próximo do neutro. Apesar disto, o pH levemente ácido no tecido subcutâneo levam a formação de micro precipitados de cristais com o zinco, o que deixa lento a sua absorção (Wagstaff & Reynolds, 2005).

Outro aspecto que deve se considerar é que as insulinas e análogos podem exercer outros efeitos, mesmo em condições adversas de conservação. Insulinas podem aumentar a captação de cálcio em diversas células, o que induz a despolarização da membrana celular (Paes, 2010), o que altera o padrão de resposta de diversas células. O efeito despolarizante é provocado por um mecanismo dependente de cálcio mediado por PI3K (Jacobus et al., 2010). Este tipo de influência pode resultar em alterações no comportamento de micro organismos aquáticos que levem

a comprometimento de suas atividades vitais, sendo esta mais uma hipótese de risco ambiental associado.

Pouco se conhece sobre a rota dos fármacos, no meio ambiente, o que inclui as insulinas e seus análogos. Mas a ocorrência desses compostos podem apresentar efeitos diversos em organismos aquáticos e terrestres, que de alguma forma pode refletir na saúde humana. Tais efeitos ocorrem em qualquer nível da hierarquia biológica, como células, órgãos, organismos, população e ecossistema (Almeida & Weber, 2005).

Nas indústrias farmacêuticas, os efluentes líquidos resultantes da limpeza dos equipamentos após a produção em batelada de medicamentos contêm compostos cuja composição varia de acordo com o produto fabricado, materiais utilizados no processo e características do processo envolvido (Maselli, 2012). Estes produtos por sua vez entram em contato direto com o meio ambiente, sendo o seu impacto desconhecido.

Este trabalho visa conhecer a influência que as insulinas e análogos exercem sobre as algas *Euglenas gracilis*, para assim verificar a existência ou não de risco de toxicidade ambiental frente a tal exposição, e visualizar possibilidades de estudos futuros em efluentes de indústrias que produzem insulinas e análogos. Tal impacto será avaliado usando as algas em biotestes que avaliam alterações de comportamento em tempo real e a avaliação de alterações na atividade fotossintética.

MATERIAIS E MÉTODOS

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

Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo experimental, envolvendo o uso de algas do gênero *Euglenas gracilis* KLEBS, obtidas da coleção da Universidade de Gottingan, Alemanha. Estas algas foram avaliadas quanto às alterações na atividade fotossintética quando submetidas ao contato com insulinas e seus análogos.

Micro-organismos e manutenção

Os testes foram realizados com cepas de *Euglenas gracilis* em meio mineral e orgânico preparado conforme descrição feita por Checcucci et al. (1976). A manutenção da cultura ocorrerá sob a exposição de luz 20 W m², foto período de 12 horas, e temperatura de 20o C. Todos os testes foram feitos a partir de uma única cultura, que foi fracionada com

o intuito de manter as características e evitar desvios relativos a preparos diferentes de meio mineral.

Soluções de insulinas e análogos

Para os testes iniciais, foram utilizadas insulinas e análogos produzidos industrialmente por processos envolvendo técnicas de biologia molecular, do laboratório Sanofi Aventis. As mesmas foram obtidas a partir de devoluções feitas a Farmácia Escola Univille, e que teriam como destino o descarte comum.

Preparação das amostras a serem testadas

Foi preparada uma solução estoque de 50 UI/ml, o que corresponde a 1,5 ml de solução usada para fins terapêuticos. As amostras testadas foram as seguintes:

Tabela 1 - Amostras e concentrações testes

AMOSTRAS TESTADAS	CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE
Insulina Humana NPH	50 UI/ml
Análogo de Insulina Glargina	50 UI/ml
Análogo de Insulina Lispro	50 UI/ml

A escolha da insulina e dos análogos se deu pela questão de se testar uma com estrutura semelhante à humana (NPH), e outras com estruturas semelhantes, cuja principal alteração era no ponto isoelétrico das mesmas, sendo uma mais estável quanto à formação do cristal na presença de zinco (glargina), e outra com formação de cristais menos intensa (lispro). O objetivo é avaliar se a velocidade de desprendimento do zinco, com conseqüente liberação deste metal ao meio impacta de forma diferenciada no comportamento das algas.

As concentrações utilizadas no teste foram de 0,5 UI/ml; 0,75 UI/ml e 1,0 UI/ml, preparadas a partir da solução estoque. A escolha não seguiu nenhum critério prévio, pois não havia nenhuma referência na literatura a respeito de concentrações deste hormônio em águas ou rios. A escolha também objetivou a busca da concentração média tóxica destes contaminantes emergentes frente às algas em testes.

As soluções nas concentrações iniciais desejadas para cada experimento foram então preparadas a partir da solução estoque e de água Mili-Q ultrapura (livre de matéria orgânica, sais e micro-organismos) obtida pelo sistema da Milipore.

Preparação dos meios de cultura para análise

As culturas foram preparadas nas condições propostas por Steinbach et al. (2012) e foram mantidas em uma única cultura de 400 ml, tratadas durante um período de uma semana a fim de se manter homogê-

neidade do meio para a aplicação dos testes futuros. Esta cultura foi subdividida em 8 frações de 50 ml, que receberam posteriormente a adição da solução dos hormônios testes.

Avaliação comportamental das algas pelo biomonitoramento via NG TOX

Os experimentos comportamentais com *Euglena gracilis* na presença de Insulinas e análogos foram realizados utilizando uma ferramenta de biomonitoramento em tempo real chamada NG-TOX, desenvolvido e homologado pela Ecobabitonga Tecnologia Ltda (Erzinger et al., 2011). A ferramenta monitora através de análise de imagem em tempo real o comportamento das algas, usando diferentes parâmetros de movimento do flagelado unicelular fotossintetizante.

O instrumento consiste de um equipamento em cuja face frontal existe conexões para quatro tubos de silicone com a outra extremidade oriunda de reservatórios. Cada frasco contém células em suspensão, fluido de limpeza, amostra da solução-teste (insulinas ou análogos) e resíduos descartáveis. Três bombas acionadas por motores de passo peristáltico transportam as células, o fluido e a amostra, até uma cubeta de vidro de 22 mm de diâmetro interno e 0,2 mm de espessura. (FIGURA 01). Os organismos-teste, em contato com um fluido, são homogeneizados e enviados para uma cubeta de observação, conectada a um microscópio, que captura as imagens das células em movimento. As imagens são gravadas por uma câmara CCD (chargedcoupledevice) e digitalizadas por uma placa conectada a um microcomputador, onde são apresentadas em um monitor. A partir de um único vetor de movimento medido, calcula-se uma variedade de parâmetros de movimento, como a quantidade e o comportamento gravitacional das células, efeitos de inibição, mobilidade, precisão da orientação, alinhamento, ângulo da distribuição principal, área, fator de forma, velocidade, velocidade máxima de subida,

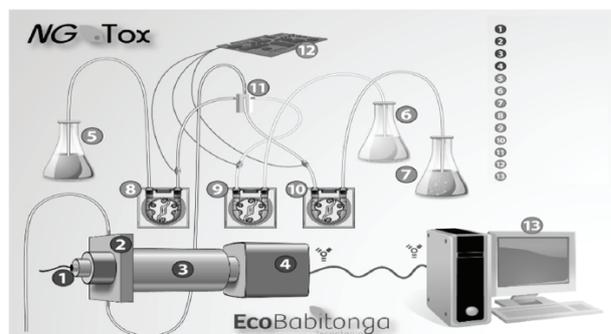


FIGURA 01 - Esquema de funcionamento e composição da ferramenta New Generation Ecotox (NG TOX) (1-lâmpada LED, 2-cubeta, 3-microscópio, 4-câmera CCD, 5-água destilada, 6-solução contendo os hormônios, 7-suspensão de *E. gracilis*, 8-10-bombas peristálticas, 11-câmera de mistura, 12-placa eletrônica e 13-computador).

velocidade máxima de descida e fototaxia (Tahedl & Häder, 2001).

Análise da alteração na atividade fotossintética

A fotossíntese das algas é usada como parâmetro ecológico nos testes de bioensaio para monitorar qualidade da água, uma vez que responde com sensibilidade às mudanças ambientais, através de uma variedade de mecanismos que influenciam a eficiência de captação de luz.

Parâmetros de fotossíntese serão medidos através de um fluorímetro de amplitude de pulso modulada - PAM 2000, WALZ, EFFELTRICH, Alemanha. O princípio de medição do PAM é baseado em mudanças no nível de fluorescência da clorofila, após a aplicação de pulsos de luz saturada. O rendimento de fotossíntese bem como de têmpera (fotoquímico e não fotoquímico) serão então calculados. As culturas testadas foram adaptadas no escuro por 1 hora, sendo que em seguida foram retirados cerca de 5ml e transferidos para cubeta do equipamento PAM. Foi submetida à emissão de 10 pulsos de luz saturante para avaliação da atividade fotossintética.

Em seguida, os dados foram plotados contra o PAR incidente (radiação fotossinteticamente ativa em mol m⁻²/s). Desta forma, foi analisada a interferência que as insulinas e análogos promoverão na extinção não fotoquímica (QN), e extinção não fotoquímica da fluorescência sem necessidade de fluorescência mínima (NPQ).

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

Etapas dos testes agudos a serem realizados

Os testes agudos foram realizados segundo cronograma proposto por Pinto (2012), no qual se tem uma avaliação imediata dos resultados, a fim de se verificar alguma reação imediata, 1 hora após; com intuito de verificar uma reação inicial mais tardia; 24 horas, para verificar alteração após um ciclo de fotoperíodo, e após e 7 dias, para verificar possíveis efeitos persistentes e adaptações frente a presença de contaminantes.

Análises estatísticas

Os dados serão avaliados através de ANOVA, técnica univariada que trata dados quantitativos em relação a uma variável independente categórica de três níveis. Para a análise entre os grupos (testes e controle), comparando todos os efeitos, a técnica utilizada será uma extensão da ANOVA, denominada ANOVA para medidas repetidas, que consiste em uma abordagem bem mais elaborada para dados parea-

dos. Esta parte consta, portanto, das comparações de resultados e médias com base nos itens quantitativos de sua amostragem.

RESULTADOS

Dentre todos os parâmetros avaliados, o que apresentou maior inibição significativa foi o sentido de orientação r-value. Quando se analisa este parâmetro em função das concentrações testadas, os resultados apontam que tal efeito é dependente da quantidade de insulina ou análogo presente, sendo que nas concentrações inferiores a 1 UI/ml (Gráficos 1 e 2), a alteração não é persistente após um ciclo de fotoperíodo (24 horas), demonstrando adaptação ou redução do efeito devido ao consumo dos contaminantes como fonte de carbono no sétimo dia.

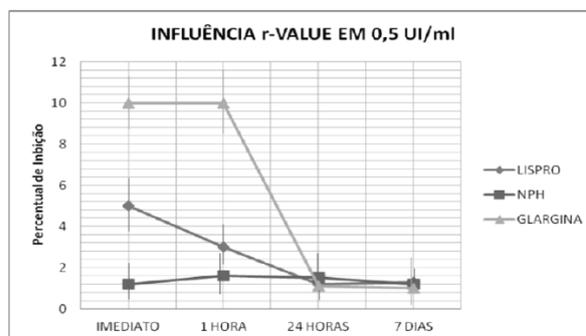


Gráfico 1 - INFLUÊNCIA COMPARATIVA NA CONCENTRAÇÃO 0,5 UI/ml: A glargina apresentou maior influência nesta concentração, levando a uma adaptação ao longo do período de estudo. A lispro apresentou um perfil semelhante, porém com menor influência. A NPA se manteve estável, sugerindo uma adaptação ao longo do tempo.

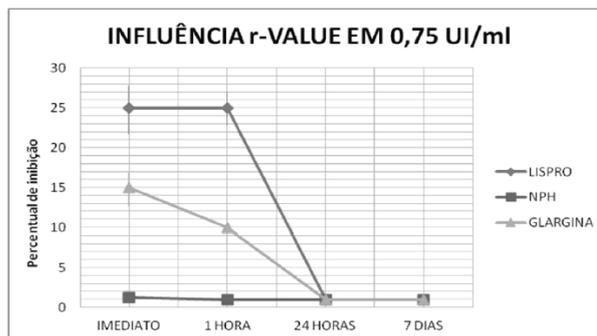


Gráfico 2 - INFLUÊNCIA COMPARATIVA NA CONCENTRAÇÃO 0,75 UI/ml: Nestas concentrações observa-se uma ação mais intensa da Lispro, seguida pela glargina. Adaptação nas duas condições ocorreu no sétimo dia. A NPH praticamente não alterou o sentido de orientação durante o período de estudo.

Na concentração de 1 UI/ml, a inibição é persistente por uma semana, tanto em lispro quanto em glargina, com uma possível adaptação das algas aos efeitos da lispro, visto que seu efeito foi maior no período de 24 horas e decaiu uma semana depois.

Já na presença de glargina, a alteração se manteve persistente com pequeno aumento no sétimo dia. (Gráfico 3).

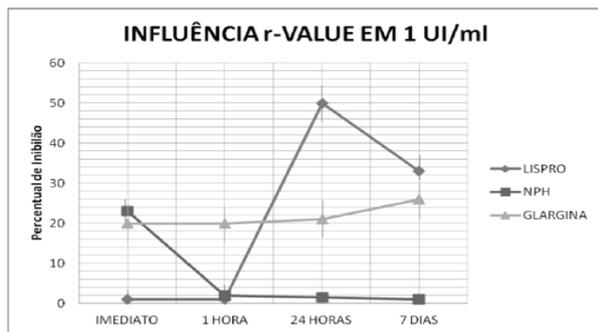


Gráfico 3 - INFLUÊNCIA COMPARATIVA NA CONCENTRAÇÃO 1 UI/ml: Nota-se que a NPH apresentou uma adaptação ao longo do período de testes. A Lispro apontou para um início sem influência, mas com aumento significativo na inibição da orientação a partir de 24 horas, com decréscimo no sétimo dia. A glargina por sua vez manteve seu potencial de inibição, com leve aumento no sétimo dia.

O zinco presente nas formulações mostrou não exercer influência sobre as algas, pois a tendência de liberação mais rápida deste metal pelo análogo lispro implicaria em uma alteração imediata mais incisiva que tenderia a diminuir com o tempo, fenômeno este não observado principalmente no Gráfico 3. Resultados similares entre análogos de ação ultra rápida e prolongada, aliada a não alterações de padrões fisiológicos das algas, bem como a ausência de fenômenos já descritos na literatura a respeito de contaminações com o zinco – como a morte das algas (Hoda, 2009), descartam a hipótese do zinco presente no meio em provocar alterações nas algas.

As alterações significativas no sentido de orientação r-value, podem ter origem em modificações no processo de coordenação do movimento flagelar algas *Euglenas gracilis*.

A atividade fotossintética no período e na concentração em que se teve a alteração do sentido de

COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA FOTOSINTÉTICA 1UI/ml - 7 DIAS DE EXPOSIÇÃO

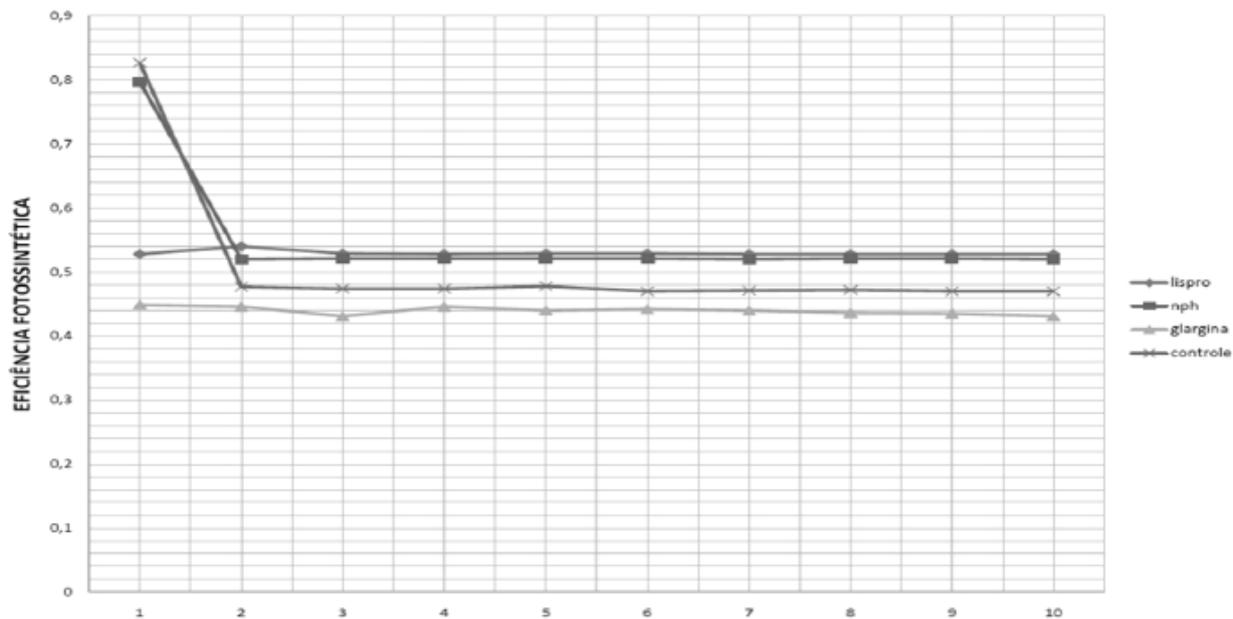


Gráfico 4 - Comparação da Eficiência fotossintética após emissão de pulsos saturantes. Observa-se um a eficiência inicial menor tanto em lispro quanto em glargina, sendo a eficiência global menor em glargina quando comparada com os demais análogos e com a NPH.

orientação r-value persistentes (1UI/ml, 7 dias) foi avaliada via PAM (Gráfico 4):

Nos testes realizados, observou-se que apenas a NPH e o controle tiveram o comportamento esperado de decréscimo na atividade frente a luz saturante. Nos casos dos análogos, tal comprometimento da eficiência ficou nítido logo no primeiro pulso, indicando comprometimento da atividade frente a exposição a luz. Por serem análogos de perfil diferente de desprendimento do zinco, reforça-se a ideia de que as alterações nada têm a ver com o perfil a liberação

deste metal, mas sim na atividade que o análogo ou seu resíduo exerce sobre a fisiologia da alga que impacta na atividade fotossintética.

DISCUSSÃO

O sentido de orientação r-value tem importância do ponto de vista ambiental, pois indica que a fotossíntese de um conjunto de algas pode estar sendo comprometida pela dificuldade de chegar a superfície

para obtenção de luz (Hader & Lebert, 1985).

Estes resultados que apontam para o fato de as insulinas e seus análogos serem possivelmente considerados como “poluentes emergentes”, uma vez que não são inócuos e se enquadrando assim na “poluente emergente (Valcárcel et al., 2011) e com possibilidade de gerar danos maiores em exposição em longo prazo (Silva, 2011).

As alterações encontradas no comportamento das algas podem estar relacionadas ao movimento flagelar afetado de alguma maneira por um influxo de cálcio celular alterado, que o mantém fora dos padrões fisiológicos adequados, levando a dificuldade destes microorganismo de alcançar a superfície para realizar fotossíntese, com já descrito por Hader et al. (2009).

As insulinas e análogos alteram a captação de cálcio e induzem a despolarização da membrana celular (Paes, 2010). O efeito despolarizante é provocado por um mecanismo dependente de cálcio mediado por PI3K, descrito por Jacobus et al. (2010) e pode ser então o fator desencadeante do fenômeno observado relativo a alteração fotossintética. Em termos gerais, a ação despolarizante é um fator que altera o padrão de resposta dessas células, e assim reflete no senso de direção das algas. Esta inibição no movimento para a superfície tem relevância para organismos fotossintéticos aquáticos, pois compromete o desempenho fotossintético em função da dificuldade de se chegar mais próximo da superfície e do contato com a luz (Hader et al., 2009).

As mudanças comportamentais não implicam toxicidade em si, pois mesmo sendo comportamentos importantes para a alga, como a subida à superfície, não se pode concluir que será tóxico ao longo do tempo, pois o organismo da alga pode se adaptar às condições e ter um comportamento adequado novamente. Os dados encontrados são importantes para o biomonitoramento, indicando algum risco, que pode vir a ocorrer devido ao comprometimento da atividade fotossintética (Arias, 2007).

Como já exposto, a crescente incidência de diabetes no mundo, e o conseqüente aumento no consumo de insulinas e análogos podem levar ao risco de contaminação emergente destes produtos, que vão além dos dispositivos utilizados, mas associado à atividade biológica que os compostos ativos podem exercer no meio ambiente, principalmente os advindos de efluentes industriais. Alterações fisiológicas, como as encontradas neste estudo referentes a alteração de sentido de orientação e redação da atividade fotossintética, evidenciam que houveram mudanças no estado fisiológico normal, frente à presença das insulinas e análogos, sem o caráter deletério comum na intoxicação, mas de alerta para riscos a longo prazo (Costa et al., 2008)

CONCLUSÃO

Com os resultados encontrado neste trabalho, constata-se que tanto as insulinas quanto seus análogos não são inertes no que se refere a atividade fisiológica das algas, exercendo sim influência sobre a capacidade destas de realizar atividade fotossintética.

Entretanto, testes com um tempo maior de exposição se faz necessário para verificar se se trata de uma condição que pode evoluir para um real risco de toxicidade ambiental, ou se as algas podem de alguma forma gerar um mecanismo que se adapte a tal condição.

Estudos em outros níveis trófico – como com micro crustáceos *Daphnia magna* - também se fazem necessários para dar uma dimensão maior desse potencial risco aqui identificad neste trabalho com algas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Departamento de Farmácia e ao Programa de Pós Graduação em Saúde e Meio Ambiente da UNIVILLE pelo apoio nesta etapa. Agradecemos ao CNPQ, pelo auxílio de fomento deste projeto através da chamada universal.

REFERÊNCIAS

- Almeida, G.A.; Weber, R.R. 2005. Fármacos na Represa Billings. Universidade de São Paulo – Instituto Oceanográfico. Cidade Universitária, São Paulo (SP).
- Arias, A.R.L.; Buss, D.F.; Albuquerque, C.; Inacio, A.F.; Freire, M.M.; Egler, M.; Mugnal, R.; Baptista, D.F. 2007. Utilização dos bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciência e Saúde Coletiva* 12 (1). P. 61-72.
- Brasil. 2004. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC N° 306, de 7 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Brasília (DF).
- Brasil. 2005 Ministério da Saúde. Manual de procedimentos de vigilância em saúde ambiental relacionada à qualidade da água para consumo humano/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília (DF).
- Brasil. 2009. Ministério da saúde. O uso de Insulinas Recombinantes Análogas à Humana de Ação Basal (Glargina e Detemir) no tratamento do Diabetes Mellitus Tipo 1. Brasília (DF).
- Brasil. 2011. Ministério da Saúde. PORTARIA N° 2.914,

- DE 12 DE DEZEMBRO DE 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.
- Checucci, A.; Colombetti, G.; Ferrara, R.; Lenci, F. 1976. Action spectra for photoaccumulation of green and colorless *Euglena*: evidence for identification of receptor pigments. *Photochem. Photobiol.* 23, 51-54.
- Ciampo L. F., Erzinger G. S., Hader D. P. 2012. Imagintox - Programa de Computador Para Análises Toxicológicas. Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI), Brasil. 840.088.493
- Costa, C. R., Olivi, P., Botta, C. M. R., Espindola, E. L. G., 2008. Toxicity in aquatic environments: discussion and evaluation methods. *Quim. Nova* 31, 1820–1830.
- Erzinger, G.S.; Ciampo, D.; Häder, D.P. 2011. Equipamento e processo para análise de toxicidade em sistemas aquáticos. Instituto nacional de propriedade industrial – inpi. Nº. 0000221105523696.
- Häder, D.P.; Lebert, M. 1985. Real time computer controlled tracking of motile microorganisms. *Photochemistry and Photobiology*, vol. 42, 509-514,
- Hader, D.P.; Richter P.R.; Schuster M.; Daiker, V.; Lebert, M. 2009 Molecular analysis of the graviperception signal transduction in the flagellate *Euglena gracilis*: involvement of a transient receptor potential-like channel and a calmodulin. *Adv SpaceRes* 43(8):1179–1184.
- Hirsch I.B, 2005. Insuline analogues. *J Diabetes Complications*. Vol 19. 178 – 181p.
- Jacobus, A.P.; Loss, E.S. & Wassermann, G.F. 2010. Pertussis toxin nullifies the depolarization of the membrane potential and stimulation of the rapid phase of Ca^{2+} entry through L-type calcium channels that are produced by follicle stimulating hormone in 10- to 12-da-old rat Sertoli cells. *Frontiers in Physiology*, v. 1, p. 1-11.
- Kock – Schulmeyer, M.; Ginebreda, A.; Postigo, C.; Lopez-Serna, R. P. S.; Brix, R.; Llorca, M.; Alda, M.L.; Petrovic, M.; Munné, A.; Tirapu, L. 2011. Wastewater reuse in Mediterranean semi-arid areas: The impact of discharges of tertiary treated sewage on the load of polar micro pollutants in the Llobregat river (NE Spain). *Chemosphere*, 82. 670 – 678p.
- Kunkel, U.; Radke, M. 2012 Fate of pharmaceuticals in rivers: Deriving a benchmark dataset at favorable attenuation conditions. *Water Res.* 46(17), 5551–5565
- Lopez-Serna, R., Petrovic, M.; Barcelo, D. 2012 Occurrence and distribution of multi-class pharmaceuticals and their active metabolites and transformation products in the Ebro river basin (NE Spain). *Sci. Total Environ.* 440, 280–289
- Paes, P.M. 2010. Multiple kinase pathways regulate voltage-dependent Ca^{2+} influx and migration in oligodendrocyte precursor cells. *The Journal of Neuroscience*, v. 30, n. 18, p. 6422-6433
- Pinto, L.H. 2012. Estudo das alterações promovidas pelos hormônios 17α etinilestradiol e 17β estradiol na atividade fotossintética e no comportamento das algas do gênero *Euglenas gracillis*. Dissertação de mestrado. Joinville, Universidade da Região de Joinville, UNIVILLE.
- Pires, A.C.; Chacra, A.R. 2008. Evolução da Insulinoterapia no diabetes melito tipo 1. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo.* 52/2.
- Silva, C.G.A.; Collins, C.H. 2011 Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. *Química Nova*, vol.34, n.4. São Paulo. 2
- Souza, C.R.; Zanetti, M.L. 2000. Administração de insulina: uma abordagem fundamental na educação em diabetes. *Rev.Esc.Enf.USP*, v.34. n.3. 264-270p.
- Steinbach H.; Krüger, V. M.; Pinto, L.H. 2012. Avaliação do risco de potencial ecotoxicológico de resíduos de 17β estradiol obtidos pós-processo oxidativo a base de peróxido de hidrogênio destinados a remoção deste hormônio. Trabalho de Conclusão de Curso. UNIVILLE.
- Tahedi H.; Häder, D.P. 2001. Automated biomonitoring using real time movimento f *Euglena gracilis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 48: 161-169p.
- Tapia, C.E.V. 2009 Diabetes mellitus e o descarte de seringas e agulhas. *Revista Gaúcha Enfermagem.* Porto Alegre (RS). 228-34p.
- Valcárcel, Y.; González A.S.; Rodriguez-Gil, J.L.; Romo R.; Gil, A.; Catalá, M. 2011. Analysis of the presence of cardiovascular and analgesic/anti-inflammatory/antipyretic drugs in fluvial and drinking water of the Madrid Region in Spain. *Chemosphere.* 82 (7), 1062-1071p.
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M. & Zambello, E. 2012. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. *Sci. Total Environ.* 429, 123–155.
- Wagstaff, A.J.; Reynolds N.A. 2005. Insulne Asparte a rewiev of its use in the management of type 1 or type 2 diabetes mellitus. *Drugs*, 64(17):1957-4.

Submetido: Março/2014

Revisado: Agosto/2017

Aceito: Agosto/2017

Publicado: 15 de Junho /2018