

**DÉBORA SANTOS SILVA BEZERRA**

**Estrógenos na bacia hidrográfica Tietê-Jacaré:  
ocorrência e avaliação do impacto ambiental**

Tese apresentada ao Instituto de Química,  
Universidade Estadual Paulista Júlio de  
Mesquita Filho – UNESP, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Doutor  
em Química.

**Orientadora: Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi**

**Araraquara/SP**

**2014**

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

### **DADOS PESSOAIS**

Nome: Débora Santos Silva Bezerra

Nome em citações bibliográficas: BEZERRA, D. S. S.

Email: dssbezerra@yahoo.com.br

### **FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO**

#### **2007 – 2009 Mestrado em Química**

Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvão, Brasil

Título: Desenvolvimento de método analítico para determinação de resíduos de pesticidas em mel de abelhas *Apis mellifera*, Ano de obtenção: 2009

Orientador: Sandro Navickiene

Bolsista da: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

#### **2003 - 2007 Graduação em Química Licenciatura**

Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvão, Brasil

Título: As propriedades específicas no ensino médio através do tema "Poluição e escassez da água".

Orientador: Elisabete Lustosa Costa

### **FORMAÇÃO COMPLEMENTAR**

**2008 – 2008** Curso de curta duração em HPLC: dos fundamentos à aplicação. Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvão, Brasil

**2008 - 2008** Curso de curta duração em Operação e manutenção básica QP2010 Plus Shimadzu. Scientific Instruments Co., SINC, Brasil

**2008 - 2008** Curso de curta duração em Princípios básicos de GC e GC-MS. Scientific Instruments Co., SINC, Brasil

**2008 - 2008** Curso de curta duração em Operação e manutenção básica do GC-2010 Shimadzu. Scientific Instruments Co., SINC, Brasil

**2007 - 2007** Curso de curta duração em Espectrometria de massas. Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, Brasil

**2006 - 2006** Curso de curta duração em A eletroquímica como ferramenta na Química Ambiental. Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvão, Brasil

### **ATUAÇÃO PROFISSIONAL**

#### **1. Governo do Estado de Sergipe - GOVERNO/SE**

**2009 – 2010** Vínculo: Professor Contratado , Enquadramento funcional: Professor Contratado , Carga horária: 25, Regime: Parcial

## **2. Universidade Federal de Sergipe - UFS**

**2008 - 2009** Vínculo: Professor Substituto , Enquadramento funcional: Professor Substituto , Carga horária: 40, Regime: Integral

**2005 - 2007** Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Bolsista/LQA , Carga horária: 20, Regime: Dedicção Exclusiva

**02/2008 - 04/2009** Conselhos, Comissões e Consultoria, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Departamento de Química. *Especificação: Representante dos discentes do curso de Mestrado*

**11/2005 - 12/2006** Projetos de pesquisa, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia. *Participação em projetos: Diagnóstico e avaliação da sub-bacia hidrográfica do Rio Poxim - Qualidade da água*

## **3. Colégio CEME - CEME**

**2009 - 2009** Vínculo: Professora , Enquadramento funcional: Professora de Química, Carga horária: 12, Regime: Parcial

## **PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **Artigos completos publicados em periódicos**

1. CARVALHO, P. H. V., JESUS, A. M. D., PRATA, V. M., BEZERRA, D. S. S., ROMAO, L. P. C., NAVICKIENE, S. Tropical peat as versatile material for solid-phase extraction of pesticides from medicinal plant *Cordia salicifolia*. *Journal of the Brazilian Chemical Society (Impresso)*. , v.21, p.659 - 664, 2010.

1. BEZERRA, D. S. S., SILVA, M. M. S., CARVALHO, P. H. V., AQUINO, A. MSPD procedure combined with gc-ms for the determination of procymidone, bifenthrin, malathion and pirimicarb in honey. *Química Nova (Impresso)*, v. 33, p. 1348-1351, 2010.

2. AQUINO, A., BEZERRA, D. S. S., NAVICKIENE, S. A Matrix Solid-Phase Dispersion Method for the Extraction of Seven Pesticides from Mango and Papaya. *Journal of Chromatographic Science*, v. 48, p. 750-754, 2010.

### **Artigos a serem submetidos**

1. BEZERRA, D. S. S.; MARCHI, M. R. R. QuEChERS procedure for determination of emerging contaminants in solid matrix environmental

2. BEZERRA, D. S. S.; MARCHI, M. R. R. Emerging contaminants in suspended particulate matter: a quick and simple method

### **Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)**

1. BEZERRA, D. S. S., SANTOS, D. B., Costa, A. S., Barbosa, C. A. E. S., FERREIRA, R. A., AGUIAR NETO, A. O., GARCIA, C. A. B., ALVES, J. P. H. Rio Poxim:Qualidade da Água e Suas Variações Sazonais In: XVII Simposio Brasileiro de Recursos Hídricos, 2007, São Paulo. **XVII Simposio Brasileiro de Recursos Hídricos.** , 2007.

### **Trabalhos publicados em anais de eventos**

1. BEZERRA, D. S. S.; MARCHI, M. R. R. Influência da sazonalidade no efeito matriz para análise de estrógenos em água superficial. In: 17º ENQA, 2013, Belo Horizonte. **17 ° Encontro Nacional de Química Ambiental.**

2. BEZERRA, D. S. S.; MARCHI, M. R. R. Estrogens in suspend particulate matter: a quick, simple and reliable method. In: ICCE, 2013, Barcelona/Espanha. **14º EuCheMS International Conference on Chemistry and the Environment.**

3. BEZERRA, D. S. S.; MARCHI, M. R. R. Método ultrassom para determinação de estrógenos em sedimento. In: ECOTOX, 2012, Porto de Galinhas. **XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia.**

4. BEZERRA, D. S. S.; MARCHI, M. R. R. Comparison of ultrasound and QuEChERS methods for estrogens analysis in sediment. In: SETAC North America, 2012, Long Beach/Califórnia. **SETAC North America, 33<sup>rd</sup> Annual Meeting.**

5. BEZERRA, D. S. S.; MACHADO, M. C.; MARCHI, M. R. R. Comparação da análise de estrógenos utilizando coluna core Shell e convencionais em HPLC/FLU. In: 16º ENQA, 2011, Campos do Jordão. **16 ° Encontro Nacional de Química Ambiental.**

6. BEZERRA, D. S. S., NAVICKIENE, S., DOREA, H. S. Pesticide analysis in honey by matrix solid phase dispersion and high-performance liquid chromatography witch photodiode array detector In: COLACRO e SIMCRO, 2008, Florianópolis. **12º Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas,** 2008.

7. BEZERRA, D. S. S., SILVA, M. M. S., DOREA, H. S., NAVICKIENE, S. Método analítico para determinação de pesticidas residuais em mel de abelhas Apis mellifera usando MSPD e GC/MS In: 32a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza. **32a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.** , 2009.

8. BEZERRA, D. S. S., SILVA, M. M. S., SILVA, T. C. S., DOREA, H. S. Método Analítico por SPE e GC-MS para Determinação de HPA em Cachaças Artesanais e Industriais In: 32a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza. **32a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química,** 2009.

9. BEZERRA, D. S. S., CARVALHO, P. H. V., SANTOS, D. B., GARCIA, C. A. B. Determinação de metais traço em mel por espectrometria de absorção atômica com atomização por chama In: IV Encontro Nacional de Química Ambiental, 2008, Aracaju. **IV Encontro Nacional de Química Ambiental**, 2008.

5. BEZERRA, D. S. S., SANTOS, D. B., PASSOS, E. A., GARCIA, C. A. B., ALVES, J. P. H. Distribuição Vertical do Sulfeto Volatilizado em meio Ácido (SVA) em Sedimentos de um Reservatório Hipereutrófico In: 30° SBQ, 2007, Águas de Lindóia. **30° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2007.

6. BEZERRA, D. S. S., SILVA, L. C. A., ALVES, J. P. H., GARCIA, C. A. B. Impacto das variações sazonais do carbono orgânico dissolvido no processo de tratamento da água In: 30° SBQ, 2007, Águas de Lindóia. **30° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2007.

7. BEZERRA, D. S. S., SANTOS, D. B., PASSOS, E. A., GARCIA, C. A. B., ALVES, J. P. H., COSTA, A. C. S. Impacto de "aterro sanitário" sobre a água e sedimento do Riacho Carrapato - Estância/SE In: 30° SBQ, 2007, Águas de Lindóia/SP. **30° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2007.

8. BEZERRA, D. S. S., PASSOS, E. A., GARCIA, C. A. B., ALVES, J. P. H. Distribuição de metais pesados em sedimentos do estuário do rio Poxim/SE In: 29a SBQ, 2006, Águas de Lindóia. **29a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2006.

## **PRODUÇÃO TÉCNICA**

1. ROMAO, L. P. C., PASSOS, E. A., BEZERRA, D. S. S. **Química Analítica II**, 2009. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional).

2. FONSECA, J. C. L. da; BEZERRA, D. S. B. Elaboração de material instrucional e treinamento dos monitores em São José do Rio Preto e Presidente Prudente para o curso à distância de Segurança Química, da UNESP, como parte de um programa de formação continuada para servidores técnicos da Pró-Reitoria de Administração da UNESP.

## **SUPERVISÕES CIENTÍFICAS**

AMARAL, B. S. Fitoestrógenos de soja em alimentos industrializados: otimização, validação e aplicação de métodos analíticos. Processo Fapesp n<sup>o</sup> 2010/01291-0.

DÉBORA SANTOS SILVA BEZERRA


Tese apresentada ao Instituto de Química,  
Universidade Estadual Paulista, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Doutora em  
Química.

Araraquara, 23 de abril de 2014.

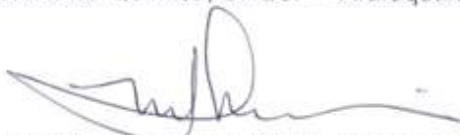
BANCA EXAMINADORA



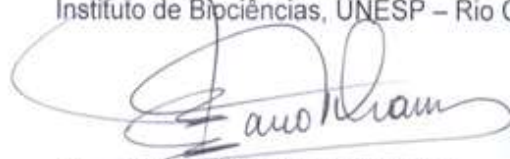
Profª Drª MARY ROSA RODRIGUES DE MARCHI (Orientadora)  
Instituto de Química, UNESP – Araraquara.



Profª Drª RAQUEL FERNANDES PUPO NOGUEIRA  
Instituto de Química, UNESP – Araraquara.



Profª Drª MARIA APARECIDA MARIN MORALES  
Instituto de Biociências, UNESP – Rio Claro.



Prof. Dr. MÁRCO TADEU GRASSI  
Centro Politécnico, UFPR – Curitiba-PR.



Prof. Dr. SANDRO NAVICKIENE  
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, UFS – São Cristóvão-SE.

*A minha mãe Clese,  
meu irmão Rafael e  
meu esposo Adysson,  
com amor, DEDICO.*

*“Enquanto houver você do outro lado, aqui do outro eu consigo me orientar...”  
(O Teatro Mágico – O anjo mais velho)*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelo dom da vida, força e coragem para enfrentar os obstáculos na realização desse sonho profissional...

Aos meus pais Clese e Carlos pelo amor sem limites, em especial a minha mãe que me deu todo apoio quando decidi sair de casa para correr atrás do meu sonho. Meu irmão e amigo Rafael pelas muitas vezes que me pediu para ficar...você foi meu incentivo para chegar até aqui!!

Ao meu esposo Ádysson, sei que não foi nada fácil suportar esses 4 anos de ausência, mas sempre se manteve ao meu lado, acreditando e confiando em mim...

A vocês devoto o meu mais intenso amor...

A grande orientadora e profissional brilhante, Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi, meu profundo agradecimento pelos conhecimentos adquiridos, apoio, paciência, confiança, respeito, conselho e por muitas vezes o colo de mãe...

Ao Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida (IBILCE – UNESP/Rio Preto) e sua aluna Ana Letícia Madeira Sanches, pelas sugestões valiosas ao trabalho e disponibilidade de toda a infraestrutura possível para realização dos ensaios *in vivo* (biomarcadores)...

A Profa. Eliana Aparecida Varanda (FCF – UNESP/Araraquara) e sua equipe, em especial, Flávia Aparecida Resende pela atenção, competência e disponibilidade do laboratório para realização dos testes de estrogenicidade (RYA)...

Ao Prof. Dr. Denilson Teixeira (UFGO), que muito gentilmente cedeu seus trabalhos para que fossem suporte na execução da parte ambiental e, ao DAE – Bauru, na pessoa do Valdir Serigatto, pelo apoio indiscutível durante o processo da escolha dos locais de amostragem e coletas...

Aos amigos e colegas do Grupo de Estudos em Saúde Ambiental e Contaminantes Orgânicos (GRESKO): Claudia P., Dayana, Elissandro, Guilherme, Marcos (Pipoca), Ovídio, Patrícia, Paulo, Renato e, a dupla Bruno e Milena (porque vocês sempre serão greskianos para mim!!)...

Àqueles que foram meus braços direito e esquerdo, os técnicos D. Marilei e William, por ter desempenhado o seu trabalho com responsabilidade e competência além do suporte durante as coletas...

Aos amigos que conquistei aqui na “Morada do Sol”, Stephane, Nathalie, Pedro, Demétrio e Danilo, pela preciosa amizade, companheirismo, fidelidade e com os quais sempre pude contar; vocês são especiais e os levarei para toda a vida...

A FAPESP e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro e bolsa concedida para execução deste projeto.

E a todos que por ventura tenha esquecido de citar, mas que sabem da sua colaboração...

...O MEU MUITO OBRIGADA!!!!

## RESUMO

Estrógenos naturais e sintéticos são microcontaminantes emergentes continuamente lançados no ambiente, incluídos na classe de substâncias capazes de afetar a saúde, crescimento e reprodução de organismos aquáticos e humanos, os alteradores endócrinos. A ocorrência de estrógenos foi investigada em água e material particulado em suspensão (SPM) de dois importantes mananciais inseridos na Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Estado de São Paulo (UGRHI 13 – Tietê/Jacaré), receptores de efluente *in natura* (Rio Bauru) ou tratado (Ribeirão das Cruzes), utilizando métodos de extração em fase sólida (SPE) para água, extração sólido-líquido para SPM e QuEChERS para sedimentos, desenvolvidos com critérios de confiabilidade analítica (exatidão, precisão, seletividade, robustez e avaliação de efeito matriz) seguido de análise simultânea por HPLC-FLD-UV em modo de eluição isocrático (60:40, MeCN:H<sub>2</sub>O ambos à 0,1% H<sub>3</sub>CCOOH) e coluna C<sub>18</sub>. Os limites de detecção e quantificação dos métodos foram determinados para ambos os detectores e variaram, respectivamente, de 0,009-1200 ng mL<sup>-1</sup> e 0,03-1700 ng mL<sup>-1</sup> (FLD) e 0,4-1,8 µg mL<sup>-1</sup> e 0,6-2,6 µg mL<sup>-1</sup> (UV) para as amostras de água, de 1,0-28,5 ng g<sup>-1</sup> e 1,6-42,7 ng g<sup>-1</sup> (FLD) para as amostras de sedimento e, de 290-430 ng g<sup>-1</sup> e 450-630 ng g<sup>-1</sup> (FLD) e 90-160 ng g<sup>-1</sup> e 130-230 ng g<sup>-1</sup> (UV) para as amostras de MPS. Os métodos apresentaram valores de recuperação média e coeficiente de variação entre 60 – 139% e 0,5 – 20%, nesta ordem. A distribuição dos estrógenos nos compartimentos aquáticos foi distinta para os mananciais e as maiores concentrações desses compostos foram encontradas na fase aquosa (0,02-17 ng mL<sup>-1</sup>) e material em suspensão (791,8-14403,8 ng g<sup>-1</sup>) do Rio Bauru. As amostras foram submetidas a ensaios *in vivo* (enzimas de biotransformação e defesa antioxidantes) e *in vitro* (RYA) para avaliar a toxicidade e possível impacto ambiental. Todas as amostras demonstraram potencial estrogênico com valores de EEQ entre 1,0 – 880,0 nM para água e 0,4 – 56,7 nM para MPS. Além disso, foi observada alteração nas enzimas de fase I e II bem como as de defesa antioxidantes em especial nos tecidos branquiais de lambaris (*Astyanax sp.*), evidenciando a atuação efetiva do mecanismo de detoxificação na eliminação dos compostos tóxicos nas condições testadas neste estudo.

Palavras-chave: Estrógenos, HPLC-FLD/UV, atividade estrogênica, biomarcadores, peixes.

## ABSTRACT

Natural and synthetic estrogens are emerging microcontaminants daily released to the environment, included in class of substances that may affect health, growth and reproduction of aquatic organisms and humans, the endocrine disrupters. Occurrence of estrogens has been researched in surface water and suspended particulate matter (SPM) in two important aquifers inserted into the Comitê da Bacia Hidrográfica Tietê-Jacaré (UGRHI 13 - Tietê/Jacaré) , effluent untrated (Bauru River) or treated (Ribeirão das Cruzes) receivers, employing solid phase extraction (SPE) for water , solid-liquid extraction for MPS and QuEChERS for sediments developed reliable analytical criteria (accuracy, precision, selectivity, robustness and evaluation of matrix effect) followed by simultaneous analysis HPLC-FLD-UV in isocratic elution (60:40 MeCN:H<sub>2</sub>O both 0.1% H<sub>3</sub>CCOOH) and C<sub>18</sub> analytical column. Methods detection and quantification limits were established for FLD and UV detectors. It ranged from 0.009 - 1200 ng mL<sup>-1</sup> and 0.03 - 1700 ng mL<sup>-1</sup> (FLD) and 0.4 - 1.8 mg mL<sup>-1</sup> and 0.6 - 2.6 mg mL<sup>-1</sup> (UV) to surface waters; from 1.0 - 28.5 ng g<sup>-1</sup> and 1.6 - 42.7 ng g<sup>-1</sup> (FLD) for sediment and 290 - 430 ng g<sup>-1</sup> and 450 - 630 ng g<sup>-1</sup> (FLD) and 90 - 160 ng g<sup>-1</sup> and 130 - 230 ng g<sup>-1</sup> (UV) for MPS. Recoveries of every method ranged from 60 - 139 % with relative standard deviations 0.5 - 20%. The estrogens partition in aquatic compartments was otherwise for rivers and highest compounds concentrations were found in Bauru River aqueous phase (0.02 - 17 ng mL<sup>-1</sup>) and suspended solids (791.8 - 14403.8 ng g<sup>-1</sup>). The samples were submitted to in vivo (biotransformation enzymes and antioxidants defenses) and in vitro (RYA) assays in order evaluate toxicity and environmental impact. All samples showed estrogenic activity with EEQ ranged from 1.0 - 880.0 nM in the RYA for surface water and 0.4 - 56.7 nM for MPS. Additionally, changes has been observed in phase I and II besides antioxidants defenses particular in the *Astyanax sp.* gill tissues, indicating activeness of detoxification mechanism for elimination of toxicants in the conditions tested in this study.

Keywords: estrogens, HPLC-FLD/UV, estrogenic activity, biomarkers, fishers.

## LISTA DE TABELAS E QUADRO

<b>Tabela I.1.</b>	Excreção diária dos estrógenos por humanos (mg/dia/indivíduo). Fonte Combalbert et al. (2010).	32
<b>Tabela I.2.</b>	Características e propriedades físico-químicas dos estrógenos de interesse.	36
<b>Tabela II.1.</b>	Métodos analíticos e parâmetros de validação para determinação de estrógenos em matrizes ambientais.	47
<b>Tabela II.2.</b>	Condições cromatográficas (HPLC/FLD e UV, Varian LC-920) adaptadas de Zocolo (2010).	53
<b>Tabela II.3.</b>	Concentração das soluções do padrão misto para detectores de FLU e UV.	53
<b>Tabela II.4.</b>	Concentrações para construção do gráfico de linearidade e curva analítica.	54
<b>Tabela II.5.</b>	Intervalo de resposta linear e coeficientes angular (a), linear (b) e de correlação (r) instrumentais para análise com detecção por fluorescência e ultravioleta.	68
<b>Tabela II.6.</b>	Comparação entre os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas para análise em modo isocrático e gradiente com detecção por fluorescência e ultravioleta.	69
<b>Tabela II.7.</b>	Limites de detecção e quantificação instrumentais, obtidos para o sistema HLPC-FLD/UV utilizado neste trabalho. Valores expressos em $\text{ng mL}^{-1}$ (FLD) e $\mu\text{g mL}^{-1}$ (UV).	70
<b>Tabela II.8.</b>	Valores de recuperação e coeficiente de variação (CV) obtidos para o método de extração SPE para água superficial (n = 9).	71
<b>Tabela II.9.</b>	Resultados de recuperação média (n = 9) $\pm$ desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) do procedimento para extração dos estrógenos em amostra de água superficial em três níveis de concentração.	72
<b>Tabela II.10.</b>	Limites de detecção e quantificação do método para extração de estrógenos em água superficial, obtidos para o sistema HLPC-FLD/UV utilizado neste trabalho. Valores expressos em $\text{ng mL}^{-1}$ (FLD e UV).	73
<b>Tabela II.11</b>	Comparação entre as etapas envolvidas no método QuEChERS original e o proposto neste trabalho.	74

<b>Tabela II.12.</b>	Resultados de recuperação média (n = 9) ± desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) do procedimento para extração dos estrógenos utilizando método QuEChERS avaliados em amostra de sedimento.	78
<b>Tabela II.13</b>	Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método. Valores expressos em ng g <sup>-1</sup> . Para estrona expresso em µg g <sup>-1</sup> .	79
<b>Tabela II.14.</b>	Valores de recuperação média (%) obtidos do procedimento para extração de estrógenos utilizando agitador vortex com e sem <i>clean up</i> .	80
<b>Tabela II.15.</b>	Valores de recuperação média (%) obtidos para o método utilizando massas e quantidade de filtros diferentes.	81
<b>Tabela II.16</b>	Resultados de recuperação média (n = 9) ± desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) do procedimento para extração dos estrógenos em amostra de material particulado em suspensão.	83
<b>Tabela II.17.</b>	Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método para extração dos estrógenos em material particulado. Valores expressos em ng g <sup>-1</sup> .	84
<b>Tabela II.18.</b>	Resultados da porcentagem de efeito matriz e análise estatística para matriz água.	87
<b>Tabela II.19.</b>	Resultados da porcentagem de efeito matriz e análise estatística para matriz sedimento.	91
<b>Tabela II.20.</b>	Resultados da porcentagem de efeito matriz e análise estatística para matriz material particulado em suspensão.	94
<b>Tabela III.1.</b>	Data de realização das coletas nos corpos hídricos correspondentes.	103
<b>Tabela III.2.</b>	Descrição e coordenadas geográficas dos pontos amostrais localizados ao longo do Ribeirão das Cruzes, Araraquara/SP.	105
<b>Tabela III.3.</b>	Descrição e coordenadas geográficas dos pontos amostrais localizados ao longo do Rio Bauru, Bauru/SP.	106
<b>Tabela III.4.</b>	Modo de detecção e quantificação dos analitos presentes nas amostras de água e material particulado coletadas nos mananciais.	108
<b>Tabela III.5.</b>	Concentração dos estrógenos naturais e sintético obtidos da análise em água e material particulado em suspensão (n = 3) do Ribeirão das Cruzes (Araraquara/SP).	110

<b>Tabela III.6.</b>	Concentração dos estrógenos naturais e sintético obtidos na análise em água e material particulado em suspensão (n = 3) do Rio Bauru (Bauru/SP).	111
<b>Tabela III.7</b>	Comparação das concentrações de estrógenos em matrizes aquosas e sólidas obtidas em outros países com os deste estudo.	118
<b>Tabela III.8.</b>	Matriz gerada pela análise de componentes principais e codificação dos locais de amostragem utilizados no tratamento estatístico.	120
<b>Tabela IV.1.</b>	Atividade estrogênica expressa em equivalentes de estradiol (EEQ nM) $\pm$ desvio padrão dos extratos de água superficial e MPS do Ribeirão das Cruzes (Araraquara/SP) e Rio Bauru (Bauru/SP).	149
<b>Tabela IV. 2.</b>	Correlação de Pearson entre as enzimas de biotransformação, defesa antioxidante e os estrógenos	172
<b>Quadro 1.</b>	Descrição dos grupos experimentais utilizados para os ensaios com biomarcadores bioquímicos.	144

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura I.1.</b>	Estrutura básica dos hormônios esteroidais. Adaptado de Gruber et al. (2002).	31
<b>Figura I.2.</b>	Estrutura química dos estrógenos naturais e sintéticos.	31
<b>Figura I.3.</b>	Biossíntese dos estrógenos naturais. Adaptado de TAIEB e LACHGAR-KELTOUM, 2011 e MARQUES et al. (2003).	34
<b>Figura I.4.</b>	Processo de alteração endócrina: (a) resposta natural; (b) efeito agonista e (c) efeito antagonista. Adaptado de BIRKETT e LESTER, 2003.	39
<b>Figura II.1.</b>	Localização do ponto de coleta (21°48'12.94"S 48°13'11.46"O) da amostra testemunha de sedimento e água superficial no Ribeirão das Cruzes, Araraquara/SP.	58
<b>Figura II.2.</b>	Método para determinação de estrógenos em água superficial. O ácido acético glacial é adicionado 30 min antes da extração.	61
<b>Figura II.3.</b>	Método para determinação de estrógenos em sedimento superficial.	62
<b>Figura II.4.</b>	Método para determinação de estrógenos em material particulado em suspensão.	63
<b>Figura II.5.</b>	Cromatogramas (HPLC/FLD – em vermelho e HPLC/UV- em preto) para soluções padrão dos estrógenos nos modos de eluição gradiente (a) e isocrático (b). Concentrações no FLD: 10 µg mL <sup>-1</sup> para E1 e 100 ng mL <sup>-1</sup> para os demais. Concentrações no UV: 20 µg mL <sup>-1</sup> para todos os analitos. 1 – E3; 2 – E2; 3 – EE2; 4 – E1.	65
<b>Figura II.6.</b>	Cromatogramas (HPLC/UV- em vermelho e HPLC/FLD- em azul) para soluções padrão dos estrógenos no modo de eluição isocrático.	66
<b>Figura II.7.</b>	Gráficos de linearidade para os estrógenos (HPLC-FLD). Linha pontilhada: limites superior e inferior; linha contínua: mediana.	67
<b>Figura II.8.</b>	Curvas analíticas em acetonitrila obtidas nos meses de Fevereiro/2013 (em azul) e Setembro/2012 (em vermelho) com detecção por FLD.	69
<b>Figura II.9.</b>	Estrutura bidentada da amina primária secundária (PSA).	75
<b>Figura II.10.</b>	Cromatogramas das amostras testemunha (a) e fortificadas (b) de sedimento, submetidas aos métodos de extração estudados (USE e QuEChERS).	77

<b>Figura II.11.</b>	Cromatogramas (HPLC – FLD) das amostras testemunha (rosa) e fortificada (azul) do material particulado em suspensão.	82
<b>Figura II.12.</b>	Cromatogramas (HPLC-FLD) obtidos na análise do efeito induzido pela matriz para (A) padrões dos estrógenos em solvente (acetonitrila) e nos extratos de (B) água superficial, (C) sedimento e (D) material particulado em suspensão. Cromatogramas obtidos para as concentrações da validação.	85
<b>Figura II.13.</b>	Curvas analíticas obtidas em solvente acetonitrila e na <b>matriz água de rio</b> detecção por FLU. Azul – curva no solvente; Vermelho – curva na matriz.	86
<b>Figura II.14.</b>	Coeficientes de variação (CV) obtidos para as análises dos padrões em solvente acetonitrila e no extrato da matriz água. Linha em destaque corresponde ao valor de CV igual a 20%.	88
<b>Figura II.15.</b>	Sobreposição dos cromatogramas (HPLC – FLD) das soluções preparadas em solvente acetonitrila (marrom), no extrato da <b>matriz água</b> (azul) e amostra testemunha (vermelha). As concentrações correspondem ao nível intermediário da validação (seção 4.3.1).	89
<b>Figura II.16.</b>	Curvas analíticas da estrona, 17 $\beta$ -estradiol, estriol e 17 $\alpha$ -etinilestradiol obtidas em solvente acetonitrila e na <b>matriz sedimento</b> submetida ao processo de extração QuEChERS detecção por FLU. Azul – curva no solvente; Vermelho – curva na matriz.	90
<b>Figura II.17.</b>	Coeficientes de variação (CV) obtidos para as análises dos padrões em solvente acetonitrila e no extrato da matriz sedimento. Linha em destaque corresponde ao valor de CV igual a 20%.	91
<b>Figura II.18.</b>	Sobreposição dos cromatogramas (HPLC – FLD) das soluções preparadas em solvente acetonitrila (vermelho), no extrato da <b>matriz sedimento</b> (azul) e amostra testemunha (roxo). As concentrações correspondem ao nível intermediário da validação (seção 4.3.2).	92
<b>Figura II.19.</b>	Curvas analíticas da estrona, 17 $\beta$ -estradiol, estriol e 17 $\alpha$ -etinilestradiol obtidas em solvente acetonitrila e na <b>matriz material particulado em suspensão</b> detecção por FLU. Azul – curva no solvente; Vermelho – curva na matriz.	93
<b>Figura II.20.</b>	Coeficientes de variação (CV) obtidos para as análises dos padrões em solvente acetonitrila e no extrato da matriz material particulado. Linha em destaque corresponde ao valor de CV igual a 20%.	94

<b>Figura II.21.</b>	Sobreposição dos cromatogramas (HPLC – FLD) das soluções preparadas em solvente acetonitrila (marrom), no extrato da <b>matriz material particulado</b> (azul) e amostra testemunha (vermelho). As concentrações correspondem ao nível intermediário da validação (seção 4.3.3).	95
<b>Figura III.1.</b>	Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI) do Estado de São Paulo (a) e divisão da UGRHI Tietê/Jacaré (UGRHI-13) (b). Fonte: Comitê da Bacia Hidrográfica Tietê-Jacaré, 2009.	100
<b>Figura III.2.</b>	Diagrama unifilar do Ribeirão das Cruzes, com os pontos de amostragem inseridos neste trabalho.	105
<b>Figura III.3.</b>	Diagrama unifilar do Rio Bauru com os pontos de amostragem inseridos neste trabalho.	106
<b>Figura III.4.</b>	Dados pluviométricos observados pela Defesa Civil do Estado de São Paulo, para os municípios de Araraquara e Bauru, no ano de 2013.	109
<b>Figura III.5.</b>	Distribuição da concentração dos estrógenos naturais E2 e E3 obtidas nas amostras de água coletadas em Fevereiro no Ribeirão das Cruzes e afluentes.	113
<b>Figura III.6.</b>	Distribuição das concentrações do estrógeno natural E1 obtidas nas amostras de água coletadas em Fevereiro e Setembro no Rio Bauru e afluentes.	114
<b>Figura III.7.</b>	Distribuição das concentrações do estrógeno natural E2 obtidas nas amostras de água coletadas em Fevereiro e Setembro no Rio Bauru e afluentes.	115
<b>Figura III.8.</b>	Distribuição das concentrações do estrógeno natural E3 obtidas nas amostras de água coletadas em Fevereiro e Setembro no Rio Bauru e afluentes.	116
<b>Figura III.9.</b>	Distribuição das concentrações do estrógeno sintético EE2 obtidas nas amostras de água coletadas em Fevereiro e Setembro no Rio Bauru e afluentes.	117
<b>Figura III.10.</b>	Biplots gerados da análise dos componentes principais (PCA) realizada a partir das concentrações dos estrógenos em águas superficiais do Ribeirão das Cruzes, Rio Bauru e respectivos afluentes	121
<b>Figura III.11.</b>	Dendograma da análise de cluster entre as amostras de água superficial coletadas no Ribeirão das Cruzes (Araraquara) e Rio Bauru (Bauru) e respectivos afluentes em diferentes períodos.	123

<b>Figura III.12.</b>	Biplots gerados da análise dos componentes principais (PCA) realizada a partir das concentrações dos estrógenos em material particulado em suspensão do Ribeirão das Cruzes, Rio Bauru e respectivos afluentes.	125
<b>Figura III.13.</b>	Dendograma da análise de cluster entre as amostras de material particulado em suspensão coletadas no Ribeirão das Cruzes (Araraquara) e Rio Bauru (Bauru) e respectivos afluentes em diferentes períodos.	127
<b>Figura III.14.</b>	Índice de correlação entre as amostras de água e material particulado em suspensão coletadas no Ribeirão das Cruzes (Araraquara) e Rio Bauru (Bauru) e respectivos afluentes em diferentes períodos.	128
<b>Figura IV. 1.</b>	Ação da EROD sobre o substrato 7-etóxi-resorufina. Adaptado de Whyte et al. (2000).	137
<b>Figura IV. 2.</b>	Reação da GSH com o substrato CDNB catalisada pela GST. Adaptado de Nogueira (2008)	138
<b>Figura IV. 3.</b>	Peixe da espécie <i>Astyanax sp.</i> utilizado neste trabalho.	143
<b>Figura IV.4.</b>	Esquema da montagem dos experimentos de exposição <i>in vivo</i> . Adaptado de Lima, 2011.	144
<b>Figura IV. 5.</b>	Atividade estrogênica para amostras ambientais água e MPS em unidades arbitrárias de fluorescência da $\beta$ -galactosidase. Os valores são medias de 3 experimentos independentes. Controle positivo, 17- $\beta$ -estradiol, FU = 10296 $\pm$ 2316.	150
<b>Figura IV. 6.</b>	Gráfico da atividade enzimática em média $\pm$ desvio padrão da 7-etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) em fígados após a exposição de lambaris ( <i>Astyanax sp.</i> ) as amostras de água do Ribeirão das Cruzes (AQA) e Bauru (BAU). Letras iguais ou ausência de letras = diferença estatística insignificante. Letras diferentes = diferença estatística significativa.	154
<b>Figura IV. 7.</b>	Gráficos da atividade enzimática em média $\pm$ desvio padrão da glutathiona-S-transferase (GST) em brânquias (A) e fígados (B) após a exposição de lambaris ( <i>Astyanax sp.</i> ) as amostras de água do Ribeirão das Cruzes (AQA) e Bauru (BAU). Letras iguais ou ausência de letras = diferença estatística insignificante. Letras diferentes = diferença estatística significativa.	156

- Figura IV. 8.** Gráficos da atividade enzimática em média  $\pm$  desvio padrão da superóxido dismutase (SOD) em brânquias (A) e fígados (B) após a exposição de lambaris (*Astyanax* sp.) as amostras de água do Ribeirão das Cruzes (AQA) e Bauru (BAU). Letras iguais ou ausência de letras = diferença estatística insignificante. Letras diferentes = diferença estatística significativa. 158
- Figura IV. 9.** Gráficos da atividade enzimática em média  $\pm$  desvio padrão da glutathione peroxidase (GPx) em brânquias (A) e fígados (B) após a exposição de lambaris (*Astyanax* sp.) as amostras de água do Ribeirão das Cruzes (AQA) e Bauru (BAU). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os rios. 160
- Figura IV.10** Gráficos da atividade enzimática em média  $\pm$  desvio padrão da catalase (CAT) em brânquias (A) e fígados (B) após a exposição de lambaris (*Astyanax* sp.) as amostras de água do Ribeirão das Cruzes (AQA) e Bauru (BAU). Letras iguais ou ausência de letras = diferença estatística insignificante. Letras diferentes = diferença estatística significativa. 162
- Figura IV.11** Gráficos da atividade enzimática em média  $\pm$  desvio padrão da glutathione redutase (GR) em brânquias (A) e fígados (B) após a exposição de lambaris (*Astyanax* sp.) as amostras de água do Ribeirão das Cruzes (AQA) e Bauru (BAU). Letras iguais ou ausência de letras = diferença estatística insignificante. Letras diferentes = diferença estatística significativa. 164
- Figura IV.12** Gráficos da atividade enzimática em média  $\pm$  desvio padrão da glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em brânquias (A) e fígados (B) após a exposição de lambaris (*Astyanax* sp.) as amostras de água do Ribeirão das Cruzes (AQA) e Bauru (BAU). Letras iguais ou ausência de letras = diferença estatística insignificante. Letras diferentes = diferença estatística significativa. 165
- Figura IV.13** Gráficos da atividade enzimática em média  $\pm$  desvio padrão do malondialdeído (MDA) em brânquias (A) e fígados (B) após a exposição de lambaris (*Astyanax* sp.) as amostras de água do Ribeirão das Cruzes (AQA) e Bauru (BAU). Letras iguais ou ausência de letras = diferença estatística insignificante. Letras diferentes = diferença estatística significativa. 167
- Figura IV.14** Biplots gerados da análise dos componentes principais (PCA) realizada a partir das concentrações dos estrógenos relacionadas as enzimas de biotransformação em brânquias e fígados. 169

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C<sub>18</sub> – Octadecil silano

CAT – Catalase

CDNB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

CV – coeficiente de variação

CYP1A – Isoforma 1A do citocromo P450

E1 – Estrona

E2 – 17 β-Estradiol

E3 - Estriol

EDCs – Alteradores endócrinos

EE2 – 17 α-Etinilestradiol

EEQ – Equivalentes de estradiol

EROD – 7-etóxiresorufina-0-deetilase

ETA – Estação de tratamento de água

ETE – Estação de tratamento de esgoto

GPx – Glutaciona peroxidase

GR – Glutaciona redutase

GSH – Glutaciona

GSSG – Glutaciona dissulfeto oxidada

GST – Glutaciona-S-transferase

HCA – análise hierárquica por cluser

Kow – Constante de partição octanol/água

Koc - coeficiente de adsorção normalizado

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

MDA – Malondialdeído

MPS – Material particulado em suspensão

PCA – Análise dos componentes principais

pKa – Constante de dissociação ácida

QuEChERS – Quick, easy, cheap, effective, robust, safe

RYA – Recombinant yeast assay - ensaio de levedura recombinante

SOD – Superóxido dismutase

SPE – Solid-phase extraction - extração em fase sólida

TBA – Ácido tiobarbitúrico

## SUMÁRIO

	<b>Introdução Geral</b>	24
	<b>Objetivos</b>	26
	<b>CAPÍTULO I - Estrógenos naturais e sintéticos</b>	
1.	<b>Introdução</b>	28
2.	<b>Revisão da Literatura</b>	29
2.1	Contaminantes emergentes	29
2.2	Estrógenos naturais e sintéticos	30
2.3	Síntese, transporte e metabolização dos estrógenos naturais e sintéticos	33
2.4	Propriedades físico-químicas e comportamento ambiental	35
2.5	Efeitos tóxicos: estrógenos como alteradores endócrinos (EDCs)	38
2.6	O sistema endócrino	41
	<b>CAPÍTULO II - Estudo analítico: otimização e validação de métodos para determinação de estrógenos em análise de matrizes ambientais</b>	
1.	<b>Introdução</b>	43
2.	<b>Revisão da Literatura</b>	44
2.1	Métodos analíticos empregados na determinação de estrógenos em matrizes ambientais	44
2.2	Sistemas Analíticos	46
2.3	Validação de métodos analíticos	48
3.	<b>Materiais e Métodos</b>	52
3.1	Padrões analíticos, solventes e reagentes	52
3.2	Condições cromatográficas de análise	52
3.3	Avaliação do desempenho do sistema analítico	53
3.3.1	Faixa de trabalho, linearidade e curvas analíticas	53
3.3.2	Limites de detecção e quantificação instrumental e do método	55
3.3.3	Precisão e exatidão	56
3.3.4	Avaliação do efeito matriz	56
3.4	Obtenção da amostra testemunha de sedimento, material particulado em suspensão e água superficial	57
3.5	Caracterização da amostra testemunha de sedimento	58
3.6	Método para análise de estrógenos em água superficial (Zocolo et al., 2010)	61
3.7	Método para análise de estrógenos em sedimento superficial	62
3.8	Método para análise de estrógenos em material particulado em suspensão	63
4.	<b>Resultados e discussão</b>	64
4.1	Otimização das condições cromatográficas de análise	64
4.2	Avaliação da resposta do sistema cromatográfico	66
4.3	Otimização e validação de métodos	70
4.3.1	Água superficial	70
4.3.2	Sedimento	73
4.3.2.1	Extração por ultrassom (USE)	73

4.3.2.2	Método QuEChERS	73
4.3.3	Material particulado em suspensão	79
4.4	Avaliação do efeito matriz sobre a resposta do sistema analítico	84
4.4.1	Água superficial	86
4.4.2	Sedimento	89
4.4.3	Material particulado em suspensão (MPS)	92
	<b>Considerações do Capítulo II</b>	96
	<b>CAPÍTULO III - Ocorrência e distribuição de estrógenos no Rio Bauru e Ribeirão das Cruzes, ambos situados na Bacia Hidrográfica Tietê – Jacaré (UGRHI 13)</b>	
1.	<b>Introdução</b>	98
2.	<b>Revisão da Literatura</b>	99
2.1	Estrógenos: partição água/sedimento/material particulado	99
2.2	Caracterização da área de estudo	99
2.2.1	Araraquara	101
2.2.2	Bauru	101
2.3	Clima	101
2.4	Economia	102
3.	<b>Materiais e Métodos</b>	103
3.1	Amostragem	103
3.2	Descrição dos pontos de amostragem	104
3.2.1	Ribeirão das Cruzes (Araraquara)	104
3.2.2	Rio Bauru (Bauru)	104
3.3	Análise Estatística dos dados	107
4.	<b>Resultados e Discussão</b>	108
4.1	Ribeirão das Cruzes (Araraquara/SP)	112
4.2	Rio Bauru (Bauru/SP)	113
4.3	Comparação entre os mananciais	117
4.4	Análise estatística dos resultados	119
4.4.1	Água Superficial	120
4.4.1.1	Análise dos Componentes Principais	120
4.4.1.2	Análise de agrupamentos hierárquicos (HCA)	122
4.4.2	Material Particulado em Suspensão	124
4.4.2.1	Análise dos Componentes Principais	124
4.4.2.2	Análise de agrupamentos hierárquicos (HCA)	126
4.4.3	Correlação: local de amostragem x período de coleta	128
	<b>Considerações do Capítulo III</b>	130
	<b>CAPÍTULO IV - Ensaios ecotoxicológicos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i></b>	
1.	<b>Introdução</b>	132
1.1	Avaliação de impacto ambiental: bioensaios	132
2.	<b>Revisão da Literatura</b>	133
2.1	Ensaios ecotoxicológicos	133

2.1.1	Teste de estrogenicidade - Recombinant Yeast Assay (RYA)	133
2.1.2	Biomarcadores de contaminação aquática	135
2.1.2.1	Fase I	136
2.1.2.2	Fase II	137
2.1.2.3	Parâmetros de estresse oxidativo	138
2.1.2.3.1	Defesas antioxidantes	139
2.1.2.3.2	Lipoperoxidação	140
3.	<b>Materiais e Métodos</b>	141
3.1	Ensaio de estrogenicidade <i>in vitro</i> – RYA	141
3.2	Biomarcadores bioquímicos <i>in vivo</i>	142
3.2.1	Obtenção e manutenção dos organismos teste	142
3.2.2	Exposição dos organismos testes	143
3.2.3	Preparo das amostras	145
3.2.4	Análise dos parâmetros bioquímicos	145
3.2.4.1	7-etoioresorufina-o-deetilase (EROD)	145
3.2.4.2	Glutathione-S-transferase (GST)	145
3.2.4.3	Catalase (CAT)	146
3.2.4.4	Glutathione peroxidase (GPx)	146
3.2.4.5	Glutathione redutase (GR)	146
3.2.4.6	Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH)	147
3.2.4.7	Peroxidação lipídica	147
3.2.5	Análise estatística	147
4.	<b>Resultados e Discussão</b>	149
4.1	Atividade estrogênica – RYA	149
4.2	Enzimas de biotransformação e defesa antioxidantes	152
4.2.1	Análise da EROD	152
4.2.2	Análise da GST	154
4.2.3	Análise da SOD	157
4.2.4	Análise da GPx e CAT	159
4.2.5	Análise da GR e G6PDH	163
4.2.6	Análise do MDA	166
4.2.7	Análise estatística dos resultados	168
4.2.7.1	Análise dos Componentes Principais	168
4.2.7.2	Análise de correlação	171
	<b>Considerações do Capítulo IV</b>	173
	<b>CONCLUSÕES GERAIS</b>	174
	<b>REFERÊNCIAS</b>	176
	<b>APÊNDICES</b>	190

## Introdução Geral

Os ecossistemas são naturalmente influenciados por fatores ambientais e principalmente por atividades antropogênicas que resultam da produção, uso indiscriminado e lançamento constante de contaminantes. Segundo Gavrilesco et al. (2014), dados publicados pela Eurostat em 2013 revelam que entre 2002 – 2011 mais de 50% da produção total de substâncias químicas correspondeu a compostos prejudiciais ao ambiente e que 70% desses compostos apresentam um risco ambiental significativo.

Dessa forma, o ambiente aquático como receptor final da maioria dos compostos orgânicos liberados, principalmente, por efluentes domésticos e industriais está sujeito aos impactos ocasionados pelo aporte contínuo de xenobióticos. Dentre esses compostos estão os microcontaminantes emergentes presentes no ambiente em baixas concentrações ( $\text{ng L}^{-1}$ ), que podem desencadear uma série de efeitos adversos na biota incluindo os seres humanos. Englobam diferentes classes de substâncias tais como pesticidas organoclorados (OCPs, do inglês *organochlorine pesticides*), surfactantes e produtos de cuidado pessoal, que incluem fármacos como os estrogênios sintéticos, dentre outros.

Diante desse contexto, neste trabalho serão realizados estudos analítico, ambiental e toxicológico para avaliar a ocorrência, distribuição e possível impacto ecotoxicológico de estrógenos nos corpos hídricos, usando como estudo de caso o Rio Bauru e Ribeirão das Cruzes, inseridos na Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos Tietê-Jacaré, localizada na região central do Estado de São Paulo.

No **Capítulo I** serão abordados aspectos gerais relacionados aos estrógenos no tocante a propriedades físico químicas, aporte e comportamento no ambiente bem como toxicidade em organismos.

No **Capítulo II** serão apresentados os procedimentos de otimização e validação de métodos analíticos para determinação de estrógenos nas matrizes de interesse ambiental - água superficial, sedimento superficial e material particulado em suspensão - com rigor analítico necessário para garantir a confiabilidade dos resultados gerados neste estudo.

Em seguida, no **Capítulo III** serão abordados os aspectos do estudo da distribuição de estrógenos nos compartimentos aquáticos por meio da análise de

água e material particulado em suspensão de corpos hídricos receptores de efluente tratado e *in natura* em diferentes períodos.

Por fim, no **Capítulo IV**, serão apresentados os resultados obtidos nos ensaios ecotoxicológicos de estrogenicidade das amostras ambientais e biomarcadores bioquímicos (enzimas de biotransformação e de defesa antioxidante) em peixes da espécie *Astyanax sp.* (lambari).

## Objetivos

Contribuir para a avaliação da ocorrência, distribuição espacial, temporal e entre as fases aquosa/particulada e possíveis impactos ecotoxicológicos de estrógenos em mananciais hídricos do Estado de São Paulo.

Para consecução deste objetivo geral, são **objetivos específicos** desta proposta:

- Otimizar e validar métodos para determinação dos estrógenos naturais estrona (E1), 17  $\beta$ -estradiol (E2) e estriol (E3) bem como do sintético 17  $\alpha$ -etinilestradiol nas matrizes ambientais água superficial, sedimento e material particulado em suspensão;
- Avaliar a distribuição desses compostos entre as fases sólida e aquosa de mananciais receptores de esgoto doméstico tratado (Ribeirão das Cruzes, Araraquara, SP) ou *in natura* (Rio Bauru, Bauru, SP);
- Verificar a influência da sazonalidade na ocorrência e distribuição dos estrógenos nos mananciais inseridos neste estudo;
- Avaliar a estrogenicidade das amostras coletadas, utilizando testes *in vitro* com levedura geneticamente modificada (Recombinant Yeast Assay);
- Utilizar biomarcadores bioquímicos em tecidos branquiais e hepáticos de peixes *Astyanax sp.* (lambari) expostos à água dos mananciais inseridos nesse estudo para avaliar possíveis impactos sobre esses organismos.

**CAPÍTULO I**  
**Estrógenos naturais e sintéticos**

## 1. Introdução

Estrógenos naturais e sintéticos são contaminantes emergentes não regulamentados, que podem ser candidatos à regulamentação futura, dependendo de investigação sobre efeitos à saúde e dados de monitoramento quanto à sua ocorrência (BARCELÓ, 2003; YAN et al., 2010). São considerados contaminantes ubíquos, pois têm sido encontrados em águas superficiais e subterrânea, sedimento, solo, efluente, lodo de esgoto e de água ou ainda, em águas de abastecimento público (PAL et al., 2010; GAVRILESCU et al., 2014).

A exposição humana a esses microcontaminantes é de preocupação crucial, precisamente por causa da sua ampla distribuição e aporte contínuo no ambiente, pois vários contaminantes emergentes são associados com perturbações endócrinas em seres humanos e na vida selvagem causando câncer e prejudicando o sistema reprodutivo (DIRTU et al., 2012; RICHARDSON e TERNES, 2011).

Devido à ausência de regulamentação dos níveis de estrógenos naturais e sintéticos e aos efeitos relacionados a esses compostos em organismos é evidente a necessidade do monitoramento dessas substâncias em matrizes ambientais incluindo sedimento e material particulado bem como a avaliação da toxicidade em níveis biológicos. Para tanto, é importante desenvolvimento de metodologias rápidas capazes de quantificar de forma precisa e segura esses microcontaminantes em todos os compartimentos do sistema aquático, pois em peixes particularmente, os efeitos são mais aparentes e, a longo prazo podem causar distúrbios sobre a taxa de crescimento populacional gerando consequências mais severas.

Neste capítulo I, serão apresentados aspectos gerais relacionados aos estrógenos no tocante a propriedades físico-químicas, aporte e comportamento no ambiente bem como sua toxicidade.

## 2. Revisão da Literatura

### 2.1. Contaminantes emergentes

Os microcontaminantes orgânicos emergentes são compostos biologicamente ativos presentes no ambiente em baixas concentrações ( $\text{ng kg}^{-1}$  ou  $\text{ng L}^{-1}$ ) e correspondem, na maioria dos casos, aos contaminantes não regulamentados no sentido tradicional (com níveis permitidos estabelecidos para determinados ambientes específicos) e, que podem ser candidatos à regulamentação futura, pois apresentam risco potencial à saúde humana e ao meio ambiente (RICHARDSON E TERNES, 2011; YAN et al., 2010). Também estão incluídos nessa classe, compostos anteriormente não considerados ou conhecidos em termos de distribuição e/ou concentração, que agora estão sendo mais amplamente detectados ou ainda substâncias que há muito tempo estão presentes no ambiente, mas cuja presença e importância só agora estão sendo elucidados (STUART et al., 2012). Na União Européia (EU), está em estudo uma proposta para estabelecimento de níveis ambientais permitidos para estas substâncias, mas ainda não existem estes valores fixados oficialmente (CONSELHO..., 2013). Para alguns desses contaminantes, o comportamento ambiental (bioacumulação, ocorrência, transporte e mecanismos de biotransformação) e toxicidade humana ainda permanecem desconhecidos.

Estas substâncias são amplamente utilizadas e podem estar presentes em uma variedade de produtos comerciais de consumo diário como medicamentos, produtos de uso veterinário e higiene pessoal, embalagens de alimentos, pesticidas, retardantes de chama, surfactantes etc (SILVA e COLLINS, 2011; DIRTU et al., 2012). O interesse no estudo destas substâncias surgiu a partir de observações sobre a ocorrência de anormalidades no sistema endócrino de animais selvagens expostos a estas substâncias (STRECK, 2009).

O aporte no ambiente para estes contaminantes é dado por fontes difusas e pontuais, principalmente, pelo lançamento de efluentes (tratados ou *in natura*) doméstico, industrial e hospitalar ou ainda pelo escoamento superficial da excreta animal e das práticas agrícolas. Nas estações de tratamento de água (ETA) ou esgoto (ETE) os contaminantes podem passar inalterados pelo tratamento convencional antes de serem descartados para o ambiente uma vez que as ETA e ETE são, em grande parte, ineficientes na remoção dos contaminantes orgânicos (MARFIL-VEGA et al, 2010; STUART et al., 2012). Outra fonte de contaminação a

ser considerada é a aplicação do lodo de esgoto produzido nas ETE em solo agrícola, que representa uma maneira econômica de reciclagem de nutrientes e matéria orgânica contida nas lamas, melhorando as propriedades físico-químicas e fertilidade do solo. No entanto, substâncias tóxicas presentes no lodo podem ser incorporadas ao solo absorvidas pelas plantas e atingir níveis tróficos mais elevados (TADEO, 2012).

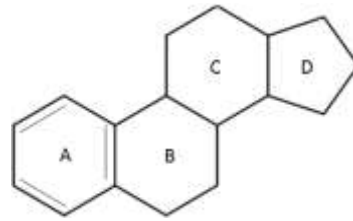
Dentre os microcontaminantes emergentes, os estrógenos naturais e sintéticos tem merecido a atenção da comunidade científica, uma vez que são produzidos naturalmente por todas as fêmeas de mamíferos, incluindo os humanos e ingeridos em formulações de fármacos. Adicionalmente o adensamento populacional faz com que haja uma alta e constante introdução destas substâncias no ambiente.

Cabe salientar que sua persistência no ambiente e capacidade de causar possíveis efeitos adversos está relacionada ao fato de serem continuamente introduzidos e não pela estabilidade das moléculas, uma vez que podem ser facilmente degradadas e suas altas taxas de remoção/transformação são compensadas pela introdução contínua, como resultado de processos industriais, descarte de produtos comerciais ou através da sua excreção na forma conjugada, livre ou metabolizada (TADEO, 2012; DIRTU et al., 2012).

## **2.2. Estrógenos naturais e sintéticos**

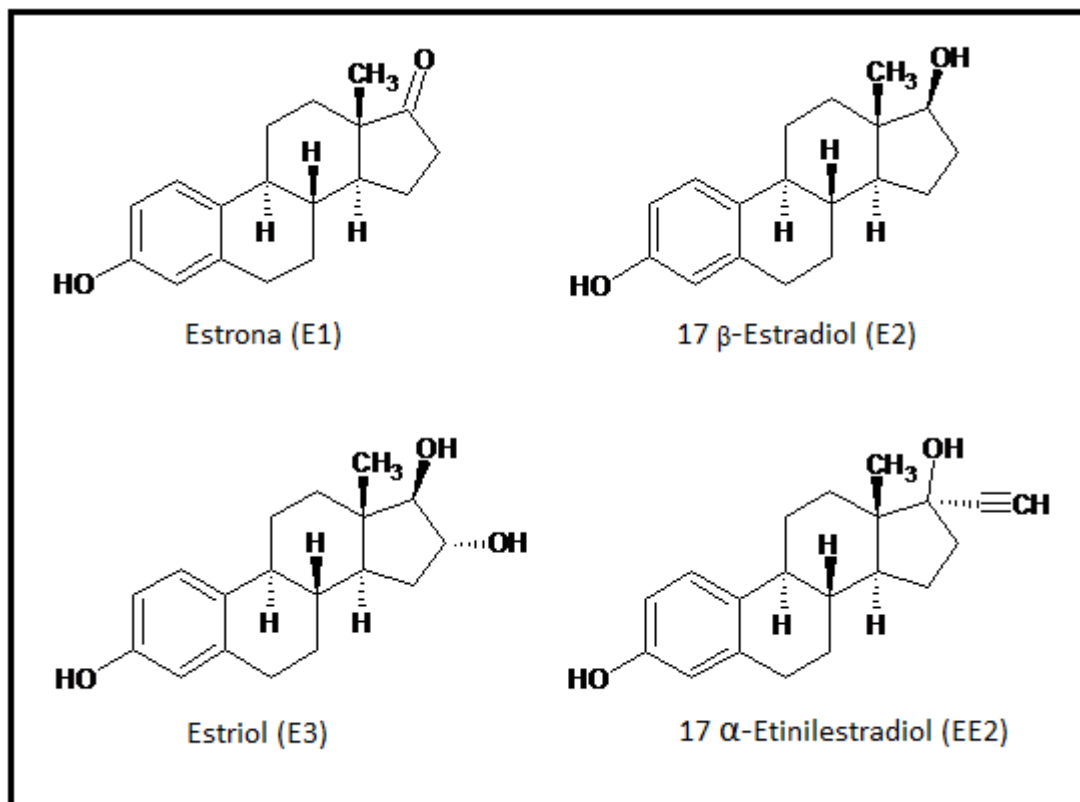
Os hormônios esteroidais são produzidos a partir do colesterol e podem ser classificados em três grupos: hormônios sexuais femininos (estrógenos), hormônios sexuais masculinos (andrógenos) e hormônios da gravidez (progesterógenos) (REIS FILHO et al., 2006).

Os hormônios sexuais femininos ou estrógenos são definidos como uma família de hormônios esteroidais responsáveis pelo desenvolvimento das características secundárias femininas e funções de reprodução. Assim como todos os esteróides, os estrógenos possuem o mesmo núcleo de anéis semelhantes ao colesterol. A Figura I.1 ilustra essa estrutura (ciclopentanofenantreno), que consiste em três anéis hexagonais (A, B e C) e um pentagonal (D). Estrógenos esteróides são caracterizados pela presença de uma hidroxila na posição 3 do anel A, necessária para a ligação com o receptor estrogênico, responsável pela sua atividade biológica (AZCOITIA et al., 2011).



**Figura I.1.** Estrutura básica dos hormônios esteroidais. Adaptado de Gruber et al. (2002).

Nos estrógenos naturais, são adicionados grupos hidroxila e carbonila no anel pentagonal (D) nas posições 17 e 16, enquanto grupos etinil são encontrados na estrutura do estrógeno sintético (posição 17 do anel pentagonal), 17- $\alpha$ -etinilestradiol, um dos principais componentes dos medicamentos contraceptivos (Figura I.2).



**Figura I.2.** Estrutura química dos estrógenos naturais e sintético.

Os estrógenos naturais fazem parte de um grupo de hormônios esteróides lipofílicos produzidos principalmente nos ovários e nos testículos em humanos e outros vertebrados, originários do colesterol ou acetil coenzima-A (TAPIERO et al., 2002; TAIEB e LACHGAR-KELTOUM, 2011). O estrógeno mais abundante e

potente, de ocorrência natural nos seres humanos, é o 17  $\beta$ -estradiol, que estimula o desenvolvimento do endométrio e influencia a libido, seguido pela estrona e estriol (principal produto de degradação do hormônio). Segundo Nakamura e colaboradores (2002), o 17  $\beta$ -estradiol é doze vezes mais ativo que a estrona e oitenta vezes mais que o estriol.

Estes hormônios são metabolizados por glucuronidação ou sulfatação, e os conjugados, solúveis em água, são excretados diariamente por mamíferos do sexo feminino e em menor quantidade pelos do sexo masculino pela urina, na forma conjugada, biologicamente inativa e, em menor proporção nas fezes, na forma livre. Os hormônios conjugados são inativos, pois perdem completamente a capacidade de ligação ao receptor estrogênico (LUCCHI et al., 2011; GRUBER et al., 2002), entretanto podem ser subsequentemente transformados em seus correspondentes esteróides livres, biologicamente ativos (LaFLEUR e SCHUG, 2011; TADEO et al., 2012). A Tabela I.1 apresenta dados de excreção de estrógenos por humanos.

**Tabela I.1.** Excreção diária dos estrógenos por humanos (mg/dia/indivíduo). Fonte Combalbert e Hernandez - Raquet. (2010).

<b>Estrógeno</b>	<b>Mulheres em idade reprodutiva</b>	<b>Mulheres durante a gravidez</b>	<b>Homens e mulheres</b>
<b>Estrona</b>	5,0 – 31	600 – 940	4,0 – 12
<b>17 <math>\beta</math> Estradiol</b>	3,0 – 19	170 – 330	1,5 – 7,0
<b>Estriol</b>	4,0 – 33	4500 – 6500	1,5 – 6,0

Os estrógenos sintéticos, encontrados em produtos farmacêuticos, são hormônios que tiveram suas estruturas moleculares alteradas. Estes compostos têm a tendência de serem mais potentes do que os estrógenos naturais e conseqüentemente, mais ativos (RAIMUNDO, 2007). Os derivados sintéticos dos estrógenos são bastante empregados como contraceptivos e também administrados no controle dos sintomas da menopausa, distúrbios fisiológicos, e no tratamento do câncer de próstata e mama (SUN et al., 2010).

Para fins terapêuticos, a ingestão diária recomendada do hormônio sintético 17  $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) situa-se entre 20 - 60  $\mu$ g para contracepção e cerca de 10  $\mu$ g para controle dos distúrbios da menopausa. Considerando-se que cerca de 30-90% da ingestão seja excretado na urina e fezes, o montante total excretado de estrógenos no meio ambiente por humanos, tem sido estimado em

aproximadamente 4,4 kg/ano/milhão de habitantes (COMBALBERT e HERNANDEZ - RAQUET, 2010).

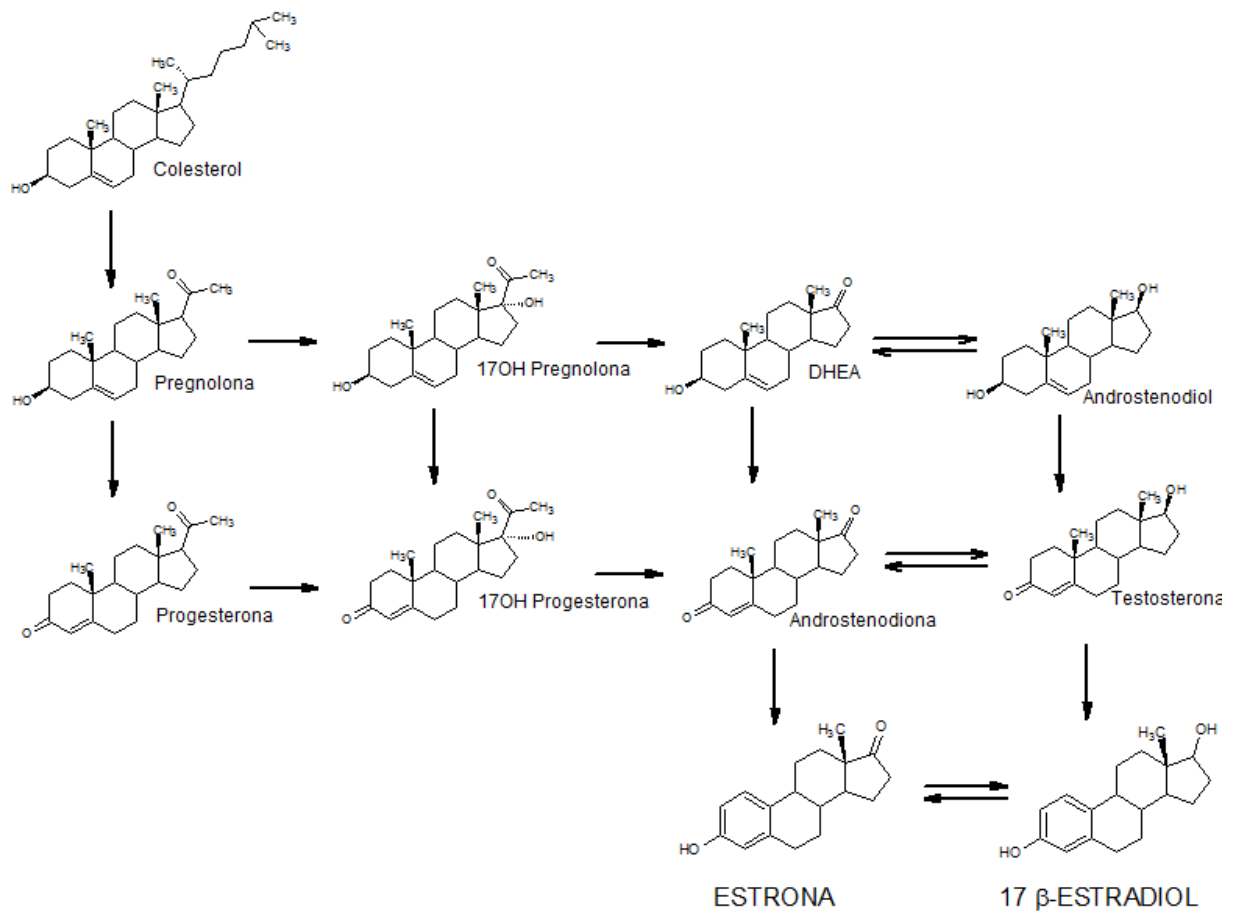
Devido à liberação natural e contínua de estrógenos por humanos para o sistema de esgoto e a sua eliminação incompleta pelos sistemas de tratamento, os hormônios entram no ambiente aquático na faixa de  $\text{ng L}^{-1}$  (GONZÁLEZ et al., 2012). Esses compostos também podem atingir as águas superficiais através do escoamento superficial tendo como fonte o esterco animal proveniente da criação extensiva de mamíferos ou, em menor escala, de animais selvagens (WENZEL, 2003; TADEO et al., 2012).

Por esse motivo, os efluentes domésticos, tratados ou *in natura*, representam a principal fonte para entrada desses contaminantes no ambiente (MARFIL-VEGA et al., 2010). Em estações de tratamento de esgoto (ETE) pode ocorrer ainda o processo de quebra da conjugação pelo contato com a elevada população de *Escherichia coli* produtora das enzimas glucuronidase e arilsulfatase (D'ASCENZO et al., 2003).

Sob condições ambientais, os estrógenos conjugados são rapidamente hidrolisados, levando aos hormônios livres e aos seus metabólitos. No ambiente aquático, E2 é biodegradado a E1, que degrada a E3 (LaFLEUR e SCHUG et al., 2011). Além disso, como alguns hormônios estão naturalmente em equilíbrio entre si, tais como o 17  $\beta$ -estradiol (forma reduzida) e a estrona (forma oxidada), durante os processos de tratamento e no ambiente aquático, pode haver a conversão de um estrógeno em outro, em função das condições oxidantes/redutoras do meio (LOPES et al., 2010).

### **2.3. Síntese, transporte e metabolização dos estrógenos naturais e sintéticos**

Os hormônios estrogênicos são derivados do colesterol e pregnenolona que, por sua vez, são transformados em androstenediona e testosterona. Estes últimos compostos são os precursores diretos dos três principais estrógenos naturais: estrona, 17  $\beta$ -estradiol e estriol. Em resumo, os diversos esteróides são formados pela redução do número de átomos de carbono de 27 (C27) para 19 (C19) e então para 18 (C18), através de reações bioquímicas mediadas por enzimas do citocromo P450 (COMBALBERT e HERNANDEZ-RAQUET, 2010; GRUBER et al., 2002). A Figura I.3 sumariza as principais etapas na biossíntese dos estrógenos naturais.



**Figura I.3.** Biossíntese dos estrógenos naturais. Adaptado de TAIEB e LACHGAR-KELTOUM, 2011 e MARQUES et al. (2003).

A biossíntese do 17  $\beta$ -estradiol é catalisada pela enzima aromatase, uma proteína da família 19A do citocromo P450, também conhecido como P450AROM. Durante uma primeira fase, o colesterol é transferido do citosol para a membrana interna da mitocôndria, onde as enzimas do citocromo P450, que catalisam a clivagem da cadeia lateral do colesterol para formar pregnolona, estão localizadas. Durante a segunda fase extra-mitocondrial, a pregnenolona torna-se progesterona. Em uma terceira etapa, 17-alfa-hidroxiprogesterona é transformado em androstenediona e testosterona (TAIEB e LACHGAR-KELTOUM, 2011; AZCOITIA et al., 2011; GRUBER et al., 2002). A aromatização é a última etapa na formação dos estrógenos, catalisada pelo complexo enzimático monooxigenase aromatase P450, que está presente no retículo endoplasmático liso (GRUBER et al., 2002). Os precursores C19 são oxidados, hidroxilados e, finalmente, desmetilados para formar os estrógenos C18, com o anel característico (AZCOITIA et al., 2011).

No corpo humano, o 17  $\beta$ -estradiol é metabolizado no fígado por hidroxilações sucessivas, onde é convertido em estriol e estrona, que serão conjugados e eliminados através da urina (60%) (TAIEB e LACHGAR-KELTOUM, 2011, GRUBER et al., 2002).

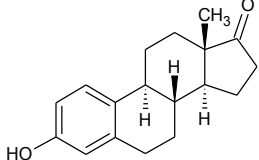
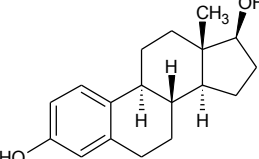
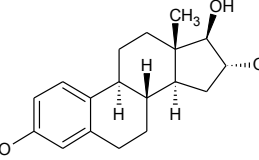
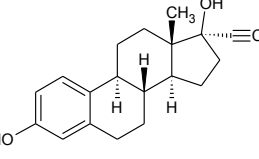
Os esteróides sintéticos são basicamente produzidos a partir de reações de alquilação (principalmente grupos metila e etila) ou esterificação dos hormônios naturais, prevenindo-os da metabolização quando no organismo (GONG et al., 2009). A adição do grupo etinil ao 17  $\beta$ -estradiol forma o 17 $\alpha$ -etinilestradiol, o qual está presente na formulação de pílulas contraceptivas.

#### **2.4. Propriedades físico-químicas e comportamento ambiental**

A partição dos contaminantes no ambiente aquático pode ser descrita pelas suas propriedades físico-químicas e condições ambientais do meio em que estão inseridos (AZZOUZ et al., 2012). Os hormônios naturais e sintéticos apresentam natureza lipofílica que, sob condições específicas de temperatura, pH, salinidade, existência de substâncias húmicas ou material particulado, sofrem influência significativa na sua solubilidade e destino, facilitando ou dificultando sua degradação no meio natural (GABET et al., 2007).

Apesar de possuírem meia vida relativamente curta (2 – 6 dias) (REIS FILHO et al., 2006) quando comparado a outros micropoluentes, os estrógenos são continuamente introduzidos no ambiente. Uma vez no compartimento aquático, esses compostos orgânicos podem sofrer advecção (transporte através da corrente), biotransformação, oxidação ou redução, adsorção nos sedimentos e resuspensão quando incorporadas ao material particulado. A Tabela I.2 apresenta as propriedades físico-químicas dos estrógenos naturais e sintéticos inseridos nesse trabalho.

**Tabela I.2.** Características e propriedades físico-químicas dos estrógenos de interesse.

Analitos	Abreviação	Fórmula	Estrutura Química	pKa*	Log K <sub>oc</sub> **	Log K <sub>ow</sub> ***	Solububilidade (mg L <sup>-1</sup> )****
<b>ESTRÓGENOS NATURAIS</b>							
Estrona	E1	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>		10,34	3,34	3,43	12,42
17β-estradiol	E2	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>		10,23	4,01	3,94	12,96
Estriol	E3	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>		10,25; 10,4	NE	3,57	13,00
<b>ESTRÓGENO SINTÉTICO</b>							
17α-etinilestradiol	EE2	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>		10,25; 10,5	2,98	4,15	4,8

\*Schäfer et al., 2011, \*\* Duong et al., 2010b, \*\*\*Combalbert e Hernandez-Raquet, 2010; \*\*\*\*em água à 25°C ; NE = não encontrado  
 pKa – constante de dissociação ácida; log K<sub>oc</sub> – coeficiente de adsorção normalizado; log K<sub>ow</sub> – constante de partição octanol/água

A capacidade de sorção do contaminante orgânico no sedimento é o fator mais significativo na redução dos estrógenos na fase aquosa e depende dos seus coeficientes de adsorção ( $K_d$ ), coeficiente de adsorção normalizado em relação a matéria orgânica ( $K_{oc}$ ) e coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ), teor de matéria orgânica, salinidade e do pH do meio principalmente para os compostos facilmente ionizáveis. Devido à baixa solubilidade em água, a baixa volatilidade, a natureza hidrofóbica, aos altos coeficientes de partição octanol/água ( $K_{ow}$ ) e de partição matéria orgânica/água intersticial ( $K_{oc}$ ) desses contaminantes emergentes, a matriz sedimento age como reservatório desses micropoluentes podendo afetar negativamente organismos aquáticos (LUO et al., 2011; GRUND et al., 2010; SCHÄFER et al., 2011).

No entanto, como os estrógenos são excretados principalmente nas formas associadas a ácido glucurônico ou sulfato, são mais hidrofílicos e menos ativos biologicamente que os estrógenos livres e, portanto, podem permanecer por mais tempo em ambientes aquáticos o que pode favorecer sua dispersão ambiental (BIRKETT e LESTER, 2003).

Os valores das constantes ( $K_{ow}$ ,  $K_{oc}$  e  $K_d$ ), utilizadas em estudos de destino ambiental para contaminantes, para maior praticidade são comumente expressas como o log destas constantes ( $\log K_{ow}$ ,  $\log K_{oc}$  e  $\log K_d$ ). Desta maneira, valores elevados são considerados indicadores de que uma substância pode ter tendência à sorção, enquanto que baixos valores indicam mobilidade ambiental uma vez que não é sorvido pela matéria orgânica do sedimento e por isso, existe alta probabilidade de ser encontrado na fase aquosa. Em geral, pode-se dizer que os estrógenos apresentam-se moderadamente sorvidos às partículas sedimentares devido a seus valores de  $\log K_d$  (2,1 - 2,9),  $\log K_{oc}$  (2,9 – 4,0) e  $\log K_{ow}$  (> 3,0) (PAL et al., 2010).

Além disso, o pKa dos estrógenos também contribui para adsorção nos sedimentos. Como os valores de pKa são maiores que 10,0 e normalmente o pH dos sedimentos é menor do que 7,0, principalmente em locais com alto teor de matéria orgânica na água, como as regiões de clima tropical, os grupamentos fenólicos estão na forma ácida conseqüentemente menos solúveis em água e mais facilmente adsorvidos as partículas do sedimento. Em águas salinas, o coeficiente de partição sedimento/água para os estrógenos é

maior, resultando na diminuição da sua solubilidade em água (PAL et al., 2010).

O teor de matéria orgânica pode ser predita pelo valor de carbono orgânico do sedimento. Quanto maior o teor, maior a concentração de substâncias húmicas e fúlvicas, responsáveis pela capacidade de adsorção.

A combinação desses fatores - solubilidade,  $K_{ow}$ ,  $K_{oc}$ ,  $K_d$ , salinidade, pH - pode dar uma indicação da mobilidade e provável sorção de determinado composto no ambiente aquático (STUART et al., 2012). Entretanto, a avaliação da ocorrência e dispersão de microcontaminantes orgânicos no ambiente é bastante complexa, não existindo modelos de aplicação que sejam abrangentes e padronizados para estes estudos (GONZÁLEZ et al., 2012).

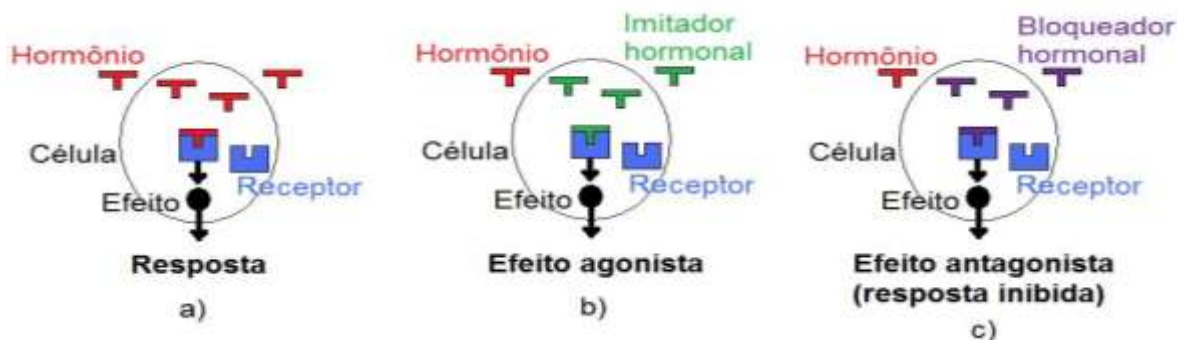
Brix e colaboradores (2010) analisaram diversos alteradores endócrinos (EDCs, do inglês *endocrine disruptors compounds*), dentre eles os estrógenos naturais, sintéticos e seus conjugados em água e sedimentos no Rio Llobregat, na região da Cataluña (Espanha). Durante seu curso, este rio passa por áreas industriais, agrícolas e urbanas densamente povoadas, que podem representar importantes fontes pontual e difusa destes compostos. Apenas o estrógeno livre estrona (E1) e um dos seus compostos conjugados (E1-sulfatada) foram detectados nas amostras de água enquanto que nenhum estrógeno foi detectado no sedimento.

## **2.5. Efeitos tóxicos: estrógenos como alteradores endócrinos (EDCs)**

Os estrógenos são um grupo de hormônios esteróides de origem natural e sintética que podem agir como alteradores endócrinos. Essa alteração endócrina ocorre quando um alterador/desregulador endócrino (EDCs) interage com o receptor hormonal, alterando a resposta natural do sistema endócrino. A alteração endócrina pode ser entendida como qualquer alteração no funcionamento do sistema endócrino, o qual é responsável pela manutenção de várias funções vitais (YAN et al., 2010) e pode ser causada por substâncias que imitam, bloqueiam ou reduzem a atividade hormonal, produzindo uma resposta indesejada, que pode afetar a saúde e reprodução de vários organismos, inclusive do homem.

Segundo a U.S. Environmental Protection Agency (EPA) alterador endócrino é definido como um agente exógeno que interfere 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 (BIRKET e LESTER, 2003).

Os processos de alteração endócrina têm uma multiplicidade de mecanismos e ações bastante complexos que incluem bloqueio, mimetização, estimulação ou inibição da produção dos hormônios naturais (GRUND et al., 2010). Os tipos de processos mais comuns envolvidos são mostrados na Figura I.4.



**Figura I.4.** Processo de alteração endócrina: (a) resposta natural; (b) efeito agonista e (c) efeito antagonista. Adaptado de BIRKETT e LESTER, 2003.

A substância pode se ligar ao receptor e ativar uma resposta, agindo como mimetizador de hormônio (efeito agonista) ou ainda, ajustar-se ao receptor, mas não produzir nenhuma resposta, apenas bloqueando, impedindo a interação do hormônio natural com o receptor (efeito antagonista). Dentre outros efeitos que podem ocorrer no sistema endócrino estão aumento ou interrupção da síntese e remoção dos hormônios e seus receptores, ou ainda, interação com vários sistemas hormonais (GRUND et al., 2010; LaFLEUR e SCHUG et al., 2011). Embora muitas pesquisas sejam focadas nos efeitos dos EDCs sobre a capacidade reprodutiva estas substâncias também podem afetar a função tireoidal, o sistema imunológico e exibir efeitos mais sutis no comportamento e memória (SÁNCHEZ-ANDRADE e KENDRICK, 2011; WARING e HARRIS, 2005).

Muitos EDCs competem com o 17  $\beta$ -estradiol pelo receptor hormonal, podendo exercer efeito de feminilização ou masculinização no organismo. Isso acontece porque os receptores de estrógeno (ER) particularmente são pouco específicos e essa característica os torna suscetíveis à ativação por uma variedade de compostos ambientais (xenoestrógenos) (FONTENELE et al., 2010). Substâncias que produzem efeitos de feminilização são conhecidas como estrogênicas e as que produzem efeitos de masculinização são as androgênicas (SÁNCHEZ-ANDRADE e KENDRICK, 2011). Em humanos, a exposição aos alteradores endócrinos tem sido associada à perda da libido, impotência, redução da qualidade e quantidade de esperma, diversos tipos de câncer do sistema reprodutivo (testículos, próstata, mama etc), ovários policísticos e endometriose (GONG et al., 2009).

Uma primeira evidência dos possíveis efeitos que esses compostos provocariam em seres humanos foi observada entre os anos 1950 a 1970 com mulheres grávidas que tomaram dietilestilbestrol, um estrógeno sintético prescrito para evitar aborto espontâneo e promover o crescimento do feto. A maioria das filhas dessas mulheres, quando adultas apresentaram infertilidade e algumas desenvolveram um tipo raro de câncer vaginal. Os filhos destas mulheres apresentaram anormalidade nos órgãos sexuais, baixa contagem de espermatozoides e tendência a desenvolverem câncer nos testículos (PAL et al., 2010). Outro estudo (SWAN et al., 2007) mostrou que a fase embrionária humana é muito mais suscetível à ação dos interferentes endócrinos em comparação ao indivíduo adulto.

Efeitos sobre a vida selvagem, principalmente animais aquáticos, também tem sido reportados (WEI e JIN-MING, 2010; POJANA et al., 2007). O principal problema relatado em consequência de estrógenos em águas naturais é a feminilização de peixes machos, detectada pela indução da vitelogenina (Vtg) no plasma, um gene normalmente presente em fêmeas considerado biomarcador da exposição estrogênica em machos jovens, que apresentam a expressão hepática da Vtg induzida quando expostos a ambientes contaminados (SANCHES, 2006). Como o sistema de desintoxicação em peixes é menos efetivo quando comparado aos mamíferos, os efeitos dos EDCs nessa espécie são mais facilmente detectáveis (SURI et al., 2007).

## 2.6. O sistema endócrino

Os organismos multicelulares possuem sistemas que controlam todas as funções fisiológicas vitais, dentre eles os sistemas nervoso e endócrino, necessários para regular a funcionalidade de todo o organismo. O sistema endócrino é essencial para plantas e animais porque é responsável pelo crescimento, reprodução, manutenção, homeostase e metabolismo (BIRKETT e LESTER, 2003).

O sistema endócrino é constituído por um conjunto de glândulas localizadas em diferentes áreas do corpo, e pelos hormônios por elas sintetizados. Esses hormônios são mensageiros químicos que lançados na corrente sanguínea alcançam as células alvo onde se ligam a sítios receptores (estruturas proteicas especializadas em reconhecimento molecular) desencadeando uma série de reações bioquímicas para produzir uma resposta biológica específica (LaFLEUR e SCHUG et al., 2011). Como esses sítios receptores têm alta afinidade por um dado hormônio, apenas baixas concentrações são requeridas para produzir tais respostas (WARING e HARRIS, 2005).

Em mamíferos, incluindo o homem, os hormônios que regulam o processo de desenvolvimento fetal, incluindo a diferenciação e determinação sexual, são normalmente transportados pela corrente sanguínea como derivados sulfatados, e por isso, não tem efeito hormonal, uma vez que não conseguem entrar na célula. As enzimas (sulfatases) localizadas na superfície da célula liberam os esteróides livres, lipossolúveis, que atravessam facilmente a membrana celular, interagindo com o receptor. Qualquer excesso de esteróides será reconjugado e excretado da célula e, aqueles que não alcançaram os receptores são inativados antes da excreção pelo fígado e rins em um processo chamado depuração metabólica (WARING e HARRIS, 2005).

Apesar da alta sensibilidade e afinidade por hormônios específicos, os receptores também são capazes de ligar-se a outras substâncias podendo causar efeito ou desencadear alguma resposta mesmo em concentração baixa, são os chamados alteradores endócrinos.

## **CAPÍTULO II**

**Estudo analítico: otimização e validação de métodos para determinação de estrógenos em análise de matrizes ambientais**

## 1. Introdução

A avaliação da ocorrência de microcontaminantes orgânicos em matrizes ambientais sólidas e líquidas ainda é um desafio importante na análise química uma vez que essas substâncias estão presentes no ambiente em baixas concentrações ( $\text{ng L}^{-1}$ ), além da alta complexidade das matrizes ambientais. Dessa forma, é necessário utilizar métodos que garantam a confiabilidade analítica para o estudo ambiental pretendido (AZZOUZ et al., 2012). Os procedimentos analíticos utilizados na determinação desses microcontaminantes em amostras ambientais, além do estabelecimento detalhado da estratégia de amostragem, envolve uma estratégia analítica que inclui um procedimento multi-etapas no preparo da amostra para análise, de forma a promover adequada extractabilidade e conversão dos analitos a uma forma mais apropriada para análise, separando-os de possíveis interferentes e concentrando-os a um nível detectável pelo sistema analítico a ser utilizado.

Neste capítulo serão apresentados procedimentos de otimização e validação de métodos analíticos, estudados nesta tese, para determinação de estrógenos naturais ( $17 \beta$ -estradiol, estrona e estriol) e sintético ( $17 \alpha$ -etinilestradiol) nas matrizes ambientais: água superficial, sedimento superficial e material particulado em suspensão.

## 2. Revisão da Literatura

### 2.1. Métodos analíticos empregados na determinação de estrógenos em matrizes ambientais

A presença de estrógenos em matrizes ambientais, tais como águas naturais e água potável, tem sido bastante reportada na literatura (WANG et al., 2011; LUCCI et al., 2011; DUONG et al., 2010a; HIBBERD et al., 2009; GONG et al., 2009), entretanto em matrizes mais complexas tais como sedimento, material particulado ou lodo de esgoto, são muito menos descritos (GONG et al., 2011; LUO et al., 2011; SUN et al., 2010; ZHANG et al., 2009; ROBINSON et al., 2009), principalmente porque são mais ricas em matéria orgânica e, portanto necessitam de tratamento mais complexo em relação à matrizes aquosas.

Métodos voltados à determinação de estrógenos em águas naturais (ou outras matrizes aquosas) estão, em sua maioria, condicionados a uma etapa de extração e pré-concentração utilizando, principalmente, a extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) com sílica modificada – C<sub>18</sub> (BRIX et al., 2010) ou fases sólidas poliméricas (poliestireno-divinilbenzeno e derivados) (WHANG et al., 2012) como sorbentes.

Por outro lado, a extração de compostos orgânicos em sedimento (e outras matrizes sólidas) é comumente realizada por técnicas tradicionais envolvendo a extração sólido-líquido tais como extração Soxhlet (ZENG et al., 2013; KIM et al., 2014), que requer alto consumo de tempo e solvente. Entretanto, novas abordagens para extração de contaminantes orgânicos de matrizes sólidas têm sido desenvolvidas para substituir a extração Soxhlet, incluindo extração assistida por microondas (MAE, do inglês *microwave assisted extraction*), extração por solventes em banho de ultrassom (USE, do inglês *ultrasound extraction*) e extração com líquido pressurizado (PLE, do inglês *pressurized liquid extraction*). Além disso, outros métodos de preparação de amostra têm sido desenvolvidos para ser mais ambientalmente amigáveis, seletivos, rápidos e miniaturizados, requerendo menor quantidade de solvente, amostra e tempo, tais como a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês *matrix solid phase dispersion*) e o QuEChERS, abreviatura das

características do processo de extração: *quick, easy, cheap, effective, robust and safe* (TADEO et al., 2012) que foi desenvolvido em 2003 inicialmente para extração de pesticidas em amostras de frutas. Modificações no método original (ANASTASIADES et al., 2003) permitem aplicações para determinação de pesticidas em outras matrizes como sedimento (BRONDI et al., 2011), solo (ZHANG et al., 2012; DROŹDŹYŃSKI et al., 2009), tecido de peixe (NORLI et al., 2011), dentre outros.

A combinação de métodos tradicionais e recentes pode, e já tem sido utilizada no intuito de aperfeiçoar a quantificação de compostos orgânicos. O método para determinação de estrógenos naturais e sintético em águas residuais proposto por Gunatilake e colaboradores (2014) incluiu a preparação da amostra utilizando SPE (cartuchos Oasis HLB) seguido pelo *clean up* proposto no processo QuEChERS ( $\text{MgSO}_4$  + amina primária-secundária +  $\text{C}_{18}$ ), derivação e determinação por LC-MS/MS. As recuperações obtidas para os estrógenos variaram de 81 - 103 %, com elevada precisão ( $n = 3$ ,  $\text{RSD} \leq 9\%$ ) e limite de quantificação entre 0,6 - 0,9  $\text{ng L}^{-1}$ .

Por se tratar de sedimentos em suspensão na coluna d'água, o material particulado, embora ainda pouco avaliado, já tem sido incluído na análise química para avaliação da biodisponibilidade dos contaminantes no compartimento aquático (AHRENS et al., 2010; GONG et al., 2012; ARDITSOGLOU e VOUTSA, 2012) e sua análise envolve basicamente uma extração sólido-líquido simples do material depositado na membrana de fibra de vidro, durante a filtração da água superficial. Sua análise é indispensável para avaliação da distribuição de contaminantes no compartimento aquático. Apesar desse fato, na análise de água por métodos convencionais, tais como extração líquido - líquido (LLE) ou extração em fase sólida (SPE), o material particulado em suspensão (MPS) é comumente separado da fase aquosa e ignorado, pois o mesmo pode causar entupimento do cartucho e baixa extractabilidade. Dessa forma, a fração dos analitos substancialmente adsorvida não é levada em consideração na avaliação da biodisponibilidade do contaminante. No entanto, a European Water Framework Directive (WFD, Directive 2000/60/EC) já requer uma investigação da amostra de água,

incluindo o MPS, pois os contaminantes hidrofóbicos tendem a adsorver a essas partículas (ERGER, 2012).

Além disso, a primeira etapa do processo analítico (amostragem) é um passo de extrema relevância para obtenção do resultado final, visto que se feita inadequadamente, a análise pode não retratar o real sentido do estudo.

## 2.2. Sistemas Analíticos

Embora os estrógenos sejam compostos com grupamentos ionizáveis e, a cromatografia líquida seja a técnica preferida, a sua determinação por cromatografia gasosa (GC) é frequentemente realizada, porém a derivação dos estrógenos é necessária para melhorar a forma do pico e fornecer detectabilidade e/ou sensibilidade adequadas. Essa etapa de derivação é feita normalmente com MSTFA (N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida), BSTFA (N-o- bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida) ou ainda MTBSTFA (N-metil-N-terc-butil-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida).

Devido à polaridade de alguns estrógenos e a baixa eficiência de derivação, o uso crescente de novas técnicas analíticas que permitem a detecção de analitos mais polares, tais como cromatografia líquida acoplada a detector de massas, LC-MS e LC-MS/MS, em conjunto com seus limites de detecção melhorados, permitiu detectar analitos que não eram rotineiramente determinados por GC-MS, como o estriol (E3) (TADEO, 2012; FERNANDEZ et al., 2009). A combinação de HPLC com espectrometria de massas tem sido utilizada com mais frequência em pesquisas recentes, devido à especificidade, seletividade e sensibilidade para analisar amostras complexas. Entretanto, a detectabilidade e seletividade adequadas dos detectores de fluorescência também permite a determinação dessas substâncias alcançando limites de detecção da ordem de  $\text{ng L}^{-1}$ .

A Tabela II.1 apresenta alguns trabalhos descritos na literatura para determinação de estrógenos em matrizes aquosas e sólidas.

**Tabela II.1.** Métodos analíticos e parâmetros de validação para determinação de estrógenos em matrizes ambientais.

REFERÊNCIA	ANALITO	MATRIZ	MÉTODO DE EXTRAÇÃO	TÉCNICA ANALÍTICA	LD (ng L <sup>-1</sup> ou ng g <sup>-1</sup> )*	LQ (ng L <sup>-1</sup> ou ng g <sup>-1</sup> )*
Stewart et al., 2014	E1, E2, E3 e EE2	sedimento	NI	GC-MS	NI	20
Li et al., 2013	E1, E2, E3 e EE2	Água de rio e subterrânea	SPE – Oasis HLB	UPLC – MS/MS	NI	NI
Andrasi et al., 2013	E2	Água de rio e MPS	SPE e sonificação	GC – MS/MS	NI	NI
Rocha et al., 2013	E1, E2 e EE2	Água de rio	SPE – Oasis HLB	GC-MS	NI	2,8 – 3,2
Huang et al., 2013	E1, E2, E3 e EE2	Água de rio, sedimento, afluente e efluente	SPE, MAE	GC-MS	NI	NI
Lima et al., 2013	E2 e EE2	Água de rio	DLLME	HPLC-FLD	2,0 – 6,5	NI
Arditsoglou et al., 2012	E1, E2, E3 e EE2	Água de rio, sedimento e MPS	SPE – Oasis HLB, sonificação	GC-MS	2,0 – 11,0 (água) e 5,0 – 9,0 (sedimento e MPS)	NI
Salvia et al., 2012	E1, E2, E3 e EE2	Solo	QuEChERS	LC-MS/MS	0,06 – 0,245	0,18 – 0,9
Duong et al., 2010a	E1, E2 e EE2	Água de rio	LLE (DCM, hexano e acetona)	GC-MS	0,5-5,0	NI
Martín et al., 2010	E1, E2, E3 e EE2	Sedimento, lodo de esgoto	sonificação acetona:MeOH	HPLC-DAD	NI	1,85-9,33

\*ng L<sup>-1</sup> para água e ng g<sup>-1</sup> para sedimento e MPS; NI – não informado; LD – limite de detecção; LQ – limite de quantificação.

### 2.3. Validação de métodos analíticos

O processo analítico, desde a extração/isolamento do analito da amostra até a determinação instrumental, pode resultar em perdas do analito e/ou a inserção de contaminantes que poderão alterar a fidedignidade dos resultados obtidos. Dessa forma, a avaliação do controle e garantia de qualidade do método é considerada parte muito importante do processo analítico (EURACHEM, 1998).

Se um método existente for modificado, por exemplo, para atender aos requisitos específicos, ou um método totalmente novo for desenvolvido, o laboratório deve se assegurar de que as características de desempenho do método atendem aos requisitos para as operações analíticas pretendidas (INMETRO, 2010). Ou seja, para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma avaliação denominada validação.

*“Validação é um processo de definição de uma condição de análise, e que confirma que o método em causa, tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer.”*

*EURACHEM, 1998*

*“A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.”*

*ANVISA, 2003*

Apesar de muitas definições e embora não haja harmonização sobre quais parâmetros devem ser incluídos em um processo de validação de um método analítico, é consenso que um método deve ser validado segundo os objetivos do estudo em que está inserido, de forma que se obtenham resultados confiáveis e interpretáveis (LANÇAS, 2004).

Segundo Ribani e colaboradores (2004), alguns desses parâmetros de confiabilidade são baseados em critérios estabelecidos pela ANVISA (Agência Nacional

de Vigilância Sanitária), INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) e EURACHEM. Para análise de microcontaminantes em matrizes complexas, como as ambientais, os critérios de validação passam pela exatidão (ou recuperação), precisão (desvio padrão relativo), linearidade, sensibilidade, especificidade, seletividade, robustez, avaliação do efeito matriz, limite de detecção e limite de quantificação.

A exatidão do método é normalmente estimada pelo uso de materiais de referência certificados (CRM) ou por estudos de recuperação, utilizados muitas vezes porque para certas aplicações, os CRM não existem ou ainda porque em alguns compartimentos ambientais amostras limpas são improváveis (CANTARERO et al., 2011). Nesses casos, a exatidão (em termos de recuperação) e precisão intermediária (porcentagem do desvio padrão relativo) podem ser utilizadas como parâmetros de avaliação do desempenho (BRIX et al., 2010).

O documento da IUPAC (THOMPSON et. al., 1999) estabelece o uso desses estudos de recuperação como componente essencial da validação de todos os métodos analíticos. Para o estudo de exatidão do método, a fortificação da amostra é o procedimento menos dispendioso e comumente aplicado para estimar, em ensaios independentes, a recuperação do analito adicionado.

Em geral, os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos estão entre 70 e 120%, com precisão de até 20%. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até 15% (COMMISSION..., 2002; BRITO et al., 2003). Além disso, na maioria dos casos, a variabilidade dos resultados é maior com a diminuição da concentração e a recuperação pode ser diferente em altas e baixas concentrações. Dessa forma, recomenda-se que a recuperação seja avaliada em três níveis de concentração (BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004).

Comumente calcula-se a exatidão do método (avaliada pela recuperação) comparando-se as áreas dos picos de cada composto extraído nos ensaios com a amostra adicionada dos analitos, com aquela obtida da solução padrão preparada no extrato da matriz (extrato de uma amostra isenta dos analitos, ou com a menor

concentração presumida dos mesmos), de forma a minimizar os erros por excesso ou redução gerados pelo efeito matriz, que podem ser bastante acentuados em matrizes complexas, como as ambientais. Esse efeito pode ser atribuído a substâncias co-extraídas que podem interferir, basicamente, de duas maneiras: 1) co-eluído com os analitos de interesse durante a análise cromatográfica (efeito matriz específico); 2) interferindo no processo cromatográfico de modo a aumentar ou reduzir a resposta do detector (efeito matriz inespecífico). Sendo assim, este parâmetro de desempenho analítico também deve ser cuidadosamente avaliado, pois permite verificar se os componentes da matriz afetam a resposta analítica de alguma maneira (PINHO, 2009) e, de acordo com Thompson e colaboradores (2002), pode muitas vezes ser a principal fonte de erro conhecida em medições analíticas.

O efeito matriz é usualmente avaliado quando são utilizadas técnicas de análise por cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) hifenizada com espectrometria de massas (MS) (FAN et al, 2011; CIMINIELLO et al, 2011). Para maior confiabilidade analítica este efeito deve ser avaliado sempre, qualquer que seja a técnica cromatográfica empregada. No entanto, na literatura este tipo de abordagem tem sido pouco relatada embora eliminar este efeito seja crítico no estabelecimento de métodos confiáveis.

Outro aspecto fundamental que tem de ser examinado na validação de um método analítico são os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). O limite de detecção é a quantidade mínima de analito detectável na amostra, porém não necessariamente quantificada como um valor exato. O limite de quantificação corresponde a menor quantidade de uma analito que pode ser quantificada com exatidão e com uma fidelidade determinada (LANÇAS, 2004). Estão disponíveis na literatura em documentos nacionais e internacionais diversas maneiras para o cálculo destes limites e, cabe ao analista estabelecer os critérios de escolha a partir de avaliação de suas especificidades, tais como complexidade da amostra, efeito induzido pela matriz e grau de confiabilidade estatística necessária.

Outro parâmetro importante da validação analítica é a determinação da linearidade, que corresponde à capacidade do método em fornecer resultados

diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa linear de aplicação. A curva analítica é o método de quantificação mais frequentemente utilizado e geralmente envolve um intervalo mais restrito da faixa linear (RIBANI et al., 2004; LANÇAS, 2004).

Finalmente, a robustez é a medida da capacidade de um método não sofrer alterações decorrentes de pequenas variações, deliberadamente introduzidas nos parâmetros do método (LANÇAS, 2004).

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Padrões analíticos, solventes e reagentes

Os padrões dos estrógenos estrona (E1), 17  $\beta$ -estradiol (E2), estriol (E3) e 17  $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, (EUA), todos com grau de pureza > 98%. As soluções padrão estoque ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) individuais dos estrógenos foram preparadas em acetonitrila (MeCN, grau HPLC).

Os solventes acetonitrila, metanol (MeOH) e ácido acético glacial ( $\text{H}_3\text{CCOOH}$ ) foram adquiridos da JT Baker, todos em grau HPLC.

Foram utilizados, ainda, o sorbente  $\text{C}_{18}$  ( $45 \mu\text{m}$ , Agilent, USA), PSA ( $47\text{-}60 \mu\text{m}$ , Varian;  $45 \mu\text{m}$ , Agilent), sulfato de magnésio anidro (Sigma Aldrich) e cloreto de sódio (p.a., Sigma Aldrich). Para o desenvolvimento do processo de extração em fase sólida foram utilizados cartuchos de fase polimérica Strata X ( $200\text{mg}/6\text{mL}$ , Phenomenex, USA).

As membranas de fibra de vidro (Boeco, Germany,  $0,6 \mu\text{m}$  de poro,  $47 \text{ mm}$  de diâmetro) utilizadas para obtenção do material particulado em suspensão aquático foram previamente calcinadas em mufla a  $450^\circ\text{C}$  ( $120 \text{ min}$ ), resfriadas e pesadas.

#### 3.2. Condições cromatográficas de análise

Nesse trabalho, foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) (Varian, modelo 920- LC), equipado com bomba ternária, injetor automático, detectores de fluorescência e ultravioleta, em série nesta sequência e software Galaxie para aquisição dos dados. As condições cromatográficas foram otimizadas para ajustar a separação cromatográfica de determinação simultânea dos estrógenos, incluindo o estriol que ainda não tinha sido estudado neste grupo de pesquisa. A Tabela II.2 apresenta as condições cromatográficas utilizadas.

**Tabela II.2.** Condições cromatográficas (HPLC/FLD e UV, Varian LC-920) adaptadas de Zocolo (2010).

<b>Coluna Luna (Phenomenex)</b>	
<b>C<sub>18</sub> (4,6 mm x 250 mm, partícula 5 µm)</b>	
Fase móvel	MeCN 0,1% H <sub>3</sub> CCOOH: H <sub>2</sub> O 0,1% H <sub>3</sub> CCOOH
Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	1,0
Detector (operando em dois canais em série)	Fluorescência ( $\lambda_{exc} = 230\text{nm}$ e $\lambda_{emi} = 306\text{nm}$ ) UV ( $\lambda = 200\text{nm}$ )
Volume de injeção automática (µL)	20
Temperatura da coluna (°C)	30
Eluição	Isocrático 60:40
Tempo de equilíbrio	1 min

\*MeCN – acetonitrila, H<sub>3</sub>CCOOH – ácido acético.

### 3.3. Avaliação do desempenho do sistema analítico

Os critérios adotados foram linearidade, precisão intermediária, exatidão, limites de detecção e quantificação.

#### 3.3.1. Faixa de trabalho, linearidade e curvas analíticas

A partir das soluções padrão estoque individual (100 µg mL<sup>-1</sup>) preparadas em acetonitrila, dos estrógenos preparou-se 25 mL da solução intermediária dos analitos nas concentrações listadas na Tabela II.3 para análise nos detectores de fluorescência (FLD) e ultravioleta (UV). Para construção da curva no FLD, a estrona (E1) foi preparada em concentração 100 vezes maior, pois sua detectabilidade é inferior em relação às demais moléculas.

**Tabela II.3.** Concentração das soluções do padrão misto para detectores de FLD e UV.

<b>Analito</b>	<b>Deteccção por FLD (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Deteccção por UV (µg mL<sup>-1</sup>)</b>
Estrona (E1)	10 <sup>a</sup>	20
17 β-estradiol (E2)	100	20
Estriol (E3)	100	20
17 α-etinilestradiol (EE2)	100	20

<sup>a</sup>µg mL<sup>-1</sup>

Para construção dos gráficos de linearidade e das curvas analíticas foram preparadas soluções de trabalho por diluições adequadas (Tabela II.4) destas soluções do padrão misto. As soluções padrão estoque e as de trabalho foram preparadas a cada 6 meses e 15 dias, respectivamente. Neste estudo cada solução padrão foi injetada três vezes, sendo utilizada nas etapas posteriores a média dos valores obtidos. Os gráficos de linearidade e as curvas analíticas foram construídas de acordo com Valente (2010) aplicando-se o Teste de Huber, para eliminação dos valores anômalos.

**Tabela II.4.** Concentrações para construção do gráfico de linearidade e curva analítica.

Pontos da Curva	Concentrações							
	Fluorescência (ng mL <sup>-1</sup> )				Ultravioleta (µg mL <sup>-1</sup> )			
	E1*	E2	E3	EE2	E1	E2	E3	EE2
Ponto 1	0,2	2,0	2,0	2,0	0,3	0,3	0,3	0,3
Ponto 2	0,35	3,5	3,5	3,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ponto 3	0,5	5,0	5,0	5,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Ponto 4	0,7	7,0	7,0	7,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Ponto 5	1,25	12,5	12,5	12,5	5,0	5,0	5,0	5,0
Ponto 6	2,5	25,0	25,0	25,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Ponto 7	4,0	40,0	40,0	40,0	8,0	8,0	8,0	8,0
Ponto 8	5,0	50,0	50,0	50,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Ponto 9	8,0	80,0	80,0	80,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Ponto 10	10,0	100,0	100,0	100,0	20,0	20,0	20,0	20,0

\* µg mL<sup>-1</sup>

No procedimento baseado no método de Huber, a linearidade é obtida calculando-se os valores de resposta (Área/Concentração) para cada nível de concentração, um valor central (mediana) e, em seguida a diferença entre cada valor individual e a mediana. Estabelece-se um interlavo de confiança, escolhendo-se um fator “k”, entre 2 e 8, para multiplicar o valor médio das diferenças em relação a mediana. Assim são estabelecidos os limites superior (mediana + k \* média das diferenças) e inferior (mediana – k \* média das diferenças). Neste trabalho, a constante

utilizada foi  $k = 3$ . Os pontos situados entre esses limites pertencem ao intervalo linear dinâmico e devem ser utilizados para a construção da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

### 3.3.2. Limites de detecção e quantificação instrumental e do método

Os limites de detecção e quantificação do sistema analítico e dos métodos para extração de estrógenos nas matrizes ambientais – água, sedimento e material particulado em suspensão – foram calculados de acordo com o proposto por Ribeiro et al. (2008), segundo as equações:

$$LD = 2 \cdot (s_y \cdot t / a_1) \cdot \left[ \sqrt{(1/N) + 1 + (y_c - \bar{y}) / \left( a_1^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right)} \right]$$

$$LQ = (y_h - a_0/a_1) + (s_y \cdot t / a_1) \cdot \left[ \sqrt{(1/N) + 1 + (y_h - \bar{y}) / \left( a_1^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right)} \right]$$

Onde:

$s_y$  - desvio padrão residual da curva analítica

$t$  –  $t$  de Student

$a_0$  e  $a_1$  - são, respectivamente coeficientes linear e angular

$N$  – número total de replicatas

$\bar{y}$  – média dos valores dos sinais analíticos

$y_c$  - ( $y$  crítico) – o intercepto do limite superior do intervalo de confiança

$\bar{x}$  - média dos valores das concentrações

$y_h$  - valor do sinal analítico para a projeção da concentração crítica no limite superior do intervalo de confiança.

Este método de estimativa dos limites baseado em parâmetros da curva analítica leva em consideração o intervalo de confiança da regressão o que resulta em maior confiabilidade estatística em relação aos métodos comumente descritos na literatura (DUONG et al., 2010; KOZLIK, et al., 2011; SALVIA et al., 2012) – visual e da relação sinal-ruído – que estão baseados em parâmetros qualitativos.

### 3.3.3. Precisão e exatidão

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade por meio do cálculo da estimativa do desvio padrão absoluto (s) e do coeficiente de variação (CV) para um número de três repetições do procedimento analítico e injeções (triplicata do tratamento x triplicata da análise = 9 replicatas), onde são aceitos CV de até 20%, dependendo do nível de concentração da amostra (INMETRO, 2010).

A eficiência dos métodos (exatidão) foi avaliada empregando-se ensaios de recuperação, estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas dos compostos de interesse, em três níveis de concentração. Os intervalos aceitáveis de recuperação para determinação de compostos em baixas concentrações situam-se entre 70 e 120%, com precisão de até 20% (COMMISSION..., 2002).

$$Rec (\%) = \frac{\text{valor obtido}}{\text{valor adicionado}} \times 100$$

$$CV (\%) = \frac{S}{X} \times 100$$

Onde:

S – desvio padrão das médias

X – média entre os valores

### 3.3.4. Avaliação do efeito matriz

O efeito de matriz, também chamado efeito da resposta cromatográfica induzida pela matriz, foi avaliado por comparação da resposta do detector (coeficiente angular) nas curvas preparadas em solvente (MeCN) com aquelas preparadas em extratos da matriz (THOMPSON et al., 2002), confirmadas pelos testes estatísticos F e t de Student (CANTARERO et al., 2011), bem como pela análise dos coeficientes de correlação ponto a ponto das curvas (CARDOSO et al., 2008) conforme apresentado pelas equações (1) e (2).a seguir.

$$1) \% \text{ efeito matriz} = \frac{\delta_{\text{matriz}} - \delta_{\text{solvente}}}{\delta_{\text{solvente}}} \times 100\%$$

$$2) CV (\%) = \frac{X_a}{X_b} \times 100$$

Onde:

$\bar{\delta}$  – coeficiente angular da curva analítica

$X_a$  – desvio padrão entre área/concentração obtidas para cada ponto das curvas no solvente e na matriz

$X_b$  – média entre área/concentração obtidas para cada ponto das curvas no solvente e na matriz

Utilizando-se a equação (1) obtém-se a variação em termos de sensibilidade (THOMPSON et al., 2002) como influência positiva ou negativa dos constituintes da matriz nos resultados, sendo aceitável uma diferença de até 10%, em módulo. Pela equação (2) faz-se a comparação do efeito matriz em cada ponto da curva (CARDOSO et al., 2008). Nesse teste, os coeficientes de variação (CV) obtidos entre a área/concentração na matriz e no solvente devem ser inferiores a 20%.

### **3.4. Obtenção da amostra testemunha de sedimento, material particulado em suspensão e água superficial**

As amostras utilizadas no processo de otimização e validação dos respectivos métodos de análise, foram coletadas no Ribeirão das Cruzes (21°48'12.94"S 48°13'11.46"O), Araraquara/SP, em uma área à montante do ponto de lançamento dos efluentes da ETE (distantes aproximadamente 4,0 km em linha reta) da cidade, de maneira que fontes potenciais de contaminação fossem minimizadas (Figura II.1).



**Figura II.1.** Localização do ponto de coleta ( $21^{\circ}48'12.94''S$   $48^{\circ}13'11.46''O$ ) da amostra testemunha de sedimento e água superficial no Ribeirão das Cruzes, Araraquara/SP.

A coleta de água superficial foi realizada utilizando-se garrafas de vidro âmbar (4L) previamente limpas com detergente neutro (Extran 4%) e secas em estufa. Após a coleta, as amostras foram mantidas em caixa isotérmica para transporte até o laboratório. Uma vez no laboratório, as amostras foram filtradas utilizando membrana de fibra de vidro  $0,60\ \mu\text{m}$  de poro (Boeco Germany), previamente calcinadas a  $450^{\circ}\text{C}$

durante 2h e pesadas. Foram separados 0,5 L em garrafas de vidro âmbar para o procedimento de extração.

O material em suspensão retido nos filtros após filtração de 0,5 L de água foi utilizado no processo de extração para material particulado em suspensão (MPS). Após filtração, os filtros foram novamente pesados depois de secos em estufa a 60°C por 2h, para evaporação da água sem degradar os analitos de interesse. A massa do MPS corresponde à diferença entre as massas do filtro com e sem MPS. Os filtros foram embalados individualmente em folha de alumínio e armazenados em freezer (-20°C) para posterior análise.

A coleta da amostra testemunha do sedimento superficial foi realizada utilizando uma draga Van Veen (capacidade 5 kg) previamente limpa com detergente neutro (Extran) e água deionizada. Uma quantidade representativa da amostra foi transferida para recipientes de alumínio (embalagens descartáveis), acondicionada em caixa isotérmica com gelo reciclável, para transporte ao laboratório. Uma vez no laboratório, o material coletado foi dividido em frascos de vidro (200 mL) para ser liofilizado (Liofilizador Modelo L1010, Liotop). Após a liofilização, as amostras foram homogeneizadas, peneiradas (60 mesh), transferidas para frascos de vidro com tampa de metal, sendo a seguir armazenadas em freezer (-20 °C).

### **3.5. Caracterização da amostra testemunha de sedimento**

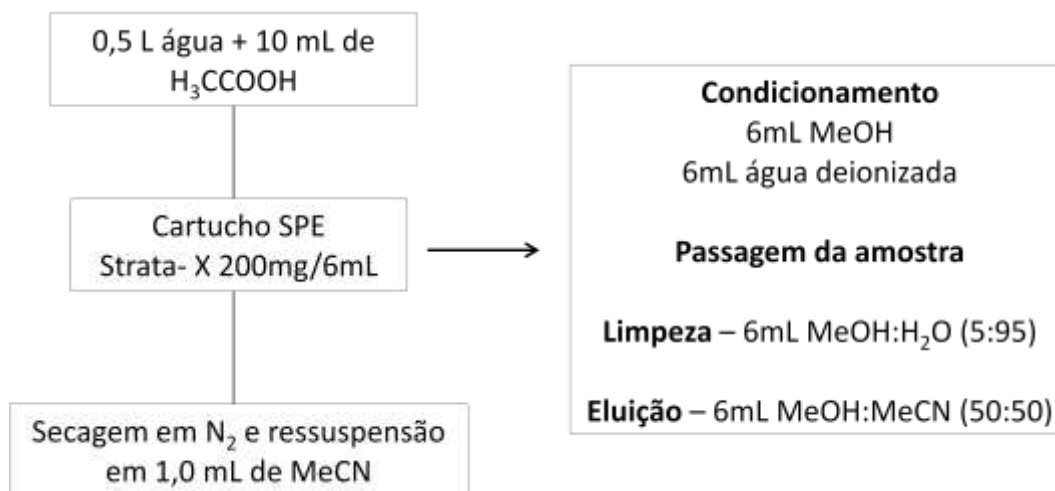
As análises de granulometria e teor de matéria orgânica da amostra testemunha de sedimento foram realizadas no Laboratório de Sedimentologia Marinha do IOUSP. A análise granulométrica foi realizada através do método de peneiração (Suguio, 1973) no qual a amostra foi passada em peneiras entre 4mm; 2,8 mm; 2,0 mm; 1,41mm; 1,0 mm; 0,71 mm; 0,5 mm; 0,35 mm; 0,25 mm; 0,177 mm; 0,125 mm; 0,088 mm; 0,062mm; 0,031 mm; 0,016 mm; 0,008 mm e < 0,004 mm com auxílio de agitador de peneiras durante 15 minutos. Em seguida, o material retido foi pesado e a classificação granulométrica do sedimento foi gerada através do programa estatístico GRADSTAT. Já para determinação de MO total (%), as amostras foram submetidas à calcinação em

mufla a 450°C por 4 horas e o resultado foi obtido pela diferença de massa obtida antes e após esse procedimento (Strickland e Parsons, 1998).

A medida de pH foi realizada em solução aquosa do sedimento em medidor de pH modelo nTA-210. Pesou-se 2,5 g da amostra, adicionou-se 10 mL de água ultra pura, agitou-se em agitador automático (Vortex). A medida foi realizada 30 minutos após a agitação, para permitir a sedimentação.

### 3.6. Método para análise de estrógenos em água superficial (Zocolo et al., 2010)

Esse método consiste em uma extração em fase sólida – SPE com cartuchos Strata-X (200 mg/6 mL) previamente condicionados com metanol (6,0 mL) e água (6,0 mL) sequencialmente. O extrato eluído com 6,0 mL da mistura MeCN:MeOH (50:50, v/v), foi posteriormente seco em fluxo suave de N<sub>2</sub> e, ressuspendido em 1,0 mL de MeCN para análise por HPLC-FLD-UV, conforme detalhado na Figura II.2.

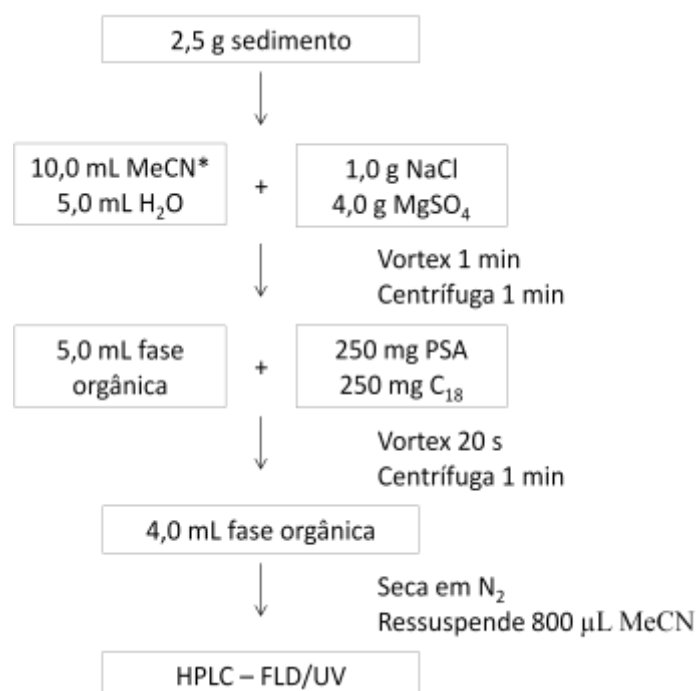


**Figura II.2.** Método para determinação de estrógenos em água superficial. O ácido acético glacial é adicionado 30 min antes da extração.

Para todos os experimentos de otimização a amostra foi fortificada em um nível intermediário de concentração (5,0 ng mL<sup>-1</sup> para E1 e 0,05 ng mL<sup>-1</sup> para E2, E3 e EE2), mantidas por 2h em frasco fechado e à temperatura ambiente para promover o equilíbrio entre analito e amostra, até o momento do procedimento de extração.

### 3.7. Método para análise de estrógenos em sedimento superficial

O procedimento de extração foi estabelecido a partir do método QuEChERS original (ANASTASIADIS, 2003), adotando algumas modificações para que fosse possível a extração de analitos menos polares, como os estrógenos, em matriz complexa, o sedimento. O método compreende uma extração com acetonitrila e partição promovida pela adição de sais, seguido de uma etapa de *clean up* conhecida como SPE dispersiva, que utiliza pequenas massas de adsorvente sem cartucho, conforme detalhado na Figura II.3.

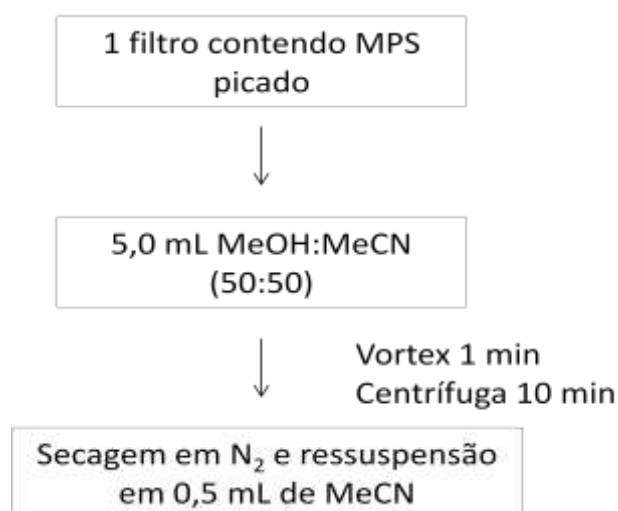


**Figura II.3.** Método para determinação de estrógenos em sedimento superficial.

Para todos os experimentos de otimização uma quantidade da amostra (2,5 g) foi fortificada em um nível intermediário de concentração ( $2,0 \mu\text{g g}^{-1}$  para E1 e  $20 \text{ ng g}^{-1}$  para E2, E3 e EE2), mantidas por 2h em frasco fechado e à temperatura ambiente para promover o equilíbrio entre analito e amostra, até o momento do procedimento de extração.

### 3.8. Método para análise de estrógenos em material particulado em suspensão

O procedimento de extração adotado para material particulado em suspensão (MPS) é simples e consiste em uma extração sólido-líquido em presença de acetonitrila:metanol e agitação intensa apenas em vortex, conforme detalhado na Figura II.4. Esse método utilizado foi proposto pelo autor considerando a pequena massa de amostra envolvida.



**Figura II.4.** Método para determinação de estrógenos em material particulado em suspensão.

Para todos os experimentos de otimização a amostra do MPS contida no filtro foi fortificada em um nível intermediário de concentração ( $250,0 \text{ ng g}^{-1}$  para E1 e  $2500 \text{ ng g}^{-1}$  para E2, E3 e EE2), mantidas por 2h em frasco fechado e à temperatura ambiente para promover o equilíbrio entre analito e amostra, até o momento do procedimento de extração.

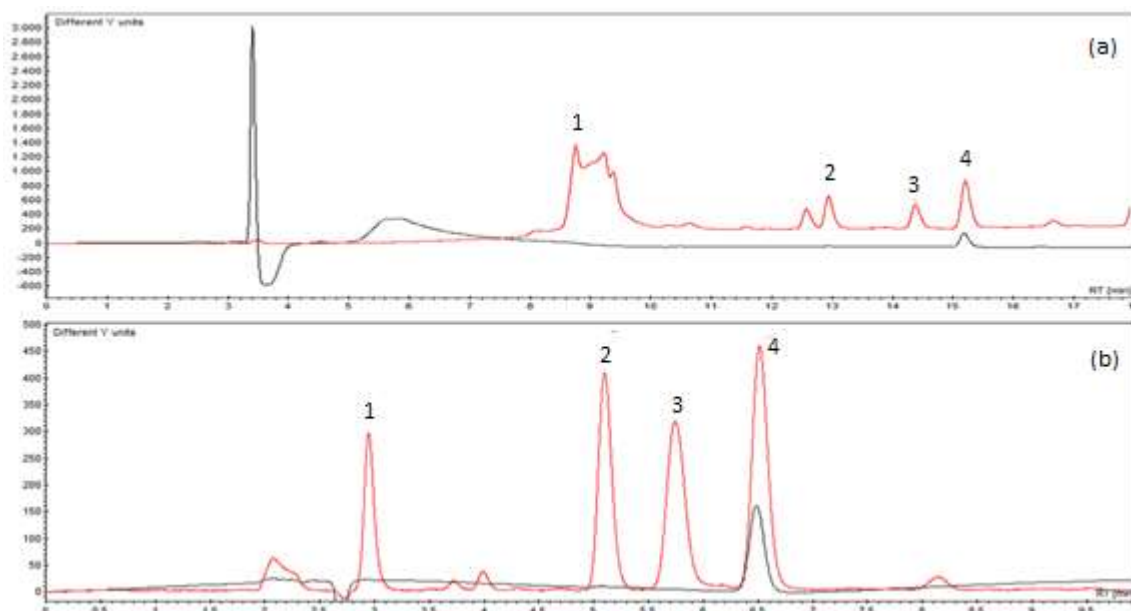
## 4. Resultados e discussão

### 4.1. Otimização das condições cromatográficas de análise

Com o intuito de avaliar as condições cromatográficas otimizadas por Zocolo (2010) em modo gradiente de eluição seguindo a programação 10 a 50% MeCN (5 min), até 60% (15 min) e, finalmente reequilibrando a 10% (2 min) com tempo de equilíbrio de 5 min e coluna cromatográfica Gemini (Phenomenex) C<sub>18</sub> (4,6mm x 250 mm, partícula 5 µm), foram realizadas injeções individuais das soluções padrão dos analitos em solvente (acetonitrila) para identificação dos tempos de retenção ( $t_R$ ) e ajuste das condições mais adequadas à separação cromatográfica de análise simultânea dos estrógenos, incluindo o estriol que ainda não tinha sido estudado neste grupo de pesquisa.

Nas condições descritas por Zocolo (2010), o estriol apresentou encaudamento e baixa resolução. Para solucionar o problema encontrado com o E3 e visando minimização da geração de resíduos, sem prejuízo da resolução cromatográfica, avaliou-se o desempenho de coluna com tecnologia *core-shell*, a Kinetex (Phenomenex) com tamanho 2,6 µm (núcleo sólido de 1,9 µm e camada porosa de 0,35 µm), entretanto essa mudança não foi possível uma vez que a pressão do sistema subiu rapidamente ocasionando prejuízos na análise e equipamento.

Utilizando-se uma coluna Luna (Phenomenex) C<sub>18</sub> (4,6 mm x 250 mm, partícula 5 µm), o método cromatográfico foi otimizado para condições de eluição isocrático 60:40 (acetonitrila:água) com o intuito de solucionar o problema com o estriol. A Figura II.5 apresenta os cromatogramas obtidos nas condições descritas.



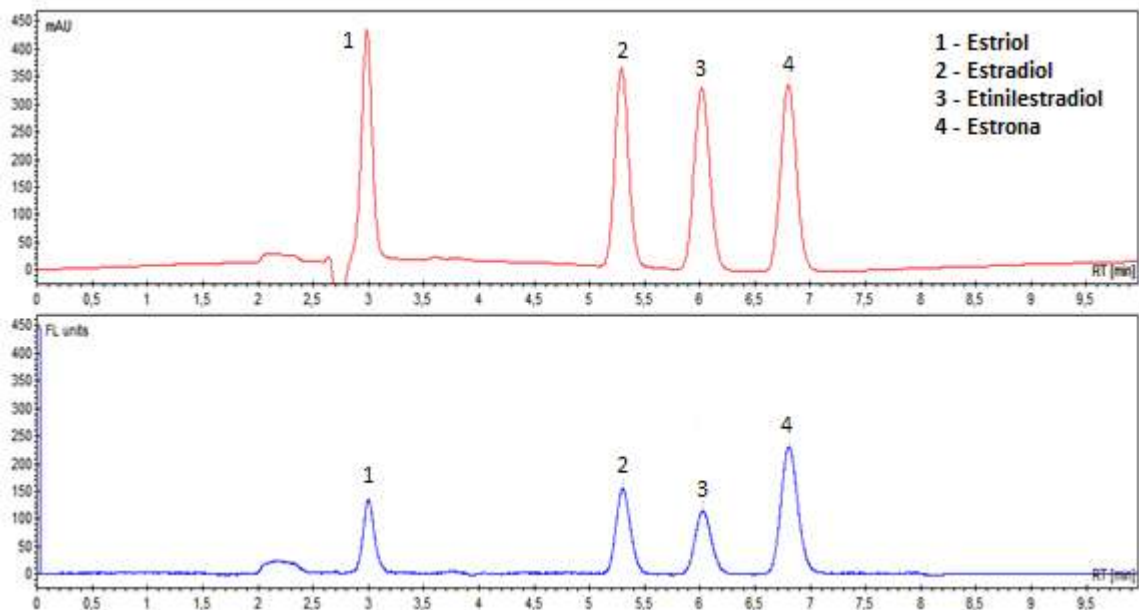
**Figura II.5.** Cromatogramas (HPLC/FLD – em vermelho e HPLC/UV- em preto) para soluções padrão dos estrógenos nos modos de eluição gradiente (a) e isocrático (b). Concentrações no FLD:  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  para E1 e  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  para os demais. Concentrações no UV:  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  para todos os analitos. 1 – E3; 2 – E2; 3 – EE2; 4 – E1.

O método com eluição isocrática mostrou-se eficiente com tempos de retenção menores e picos bem definidos comparados ao método utilizado anteriormente neste grupo de pesquisa. Dessa forma, este método foi selecionado para análise cromatográfica de estrógenos realizada nesta tese. As condições ótimas foram apresentadas na Tabela II.2.

A fase móvel foi acidificada com a finalidade de manter os analitos e os silanóis residuais da coluna na forma protonada impedindo uma interação irreversível e minimizando a possibilidade de encaudamento dos picos cromatográficos.

Além disso, avaliou-se a detectabilidade dos estrógenos no ultravioleta levando em consideração prováveis concentrações elevadas dos analitos nas amostras de água superficial, sedimento e material particulado do Rio Bauru, da cidade que leva o mesmo nome, uma vez que esta não possui tratamento de esgoto.

Os cromatogramas obtidos para essas duas condições são mostrados na Figura II.6 onde se pode observar resolução e sensibilidade adequadas com picos estreitos e sem encaudamento.



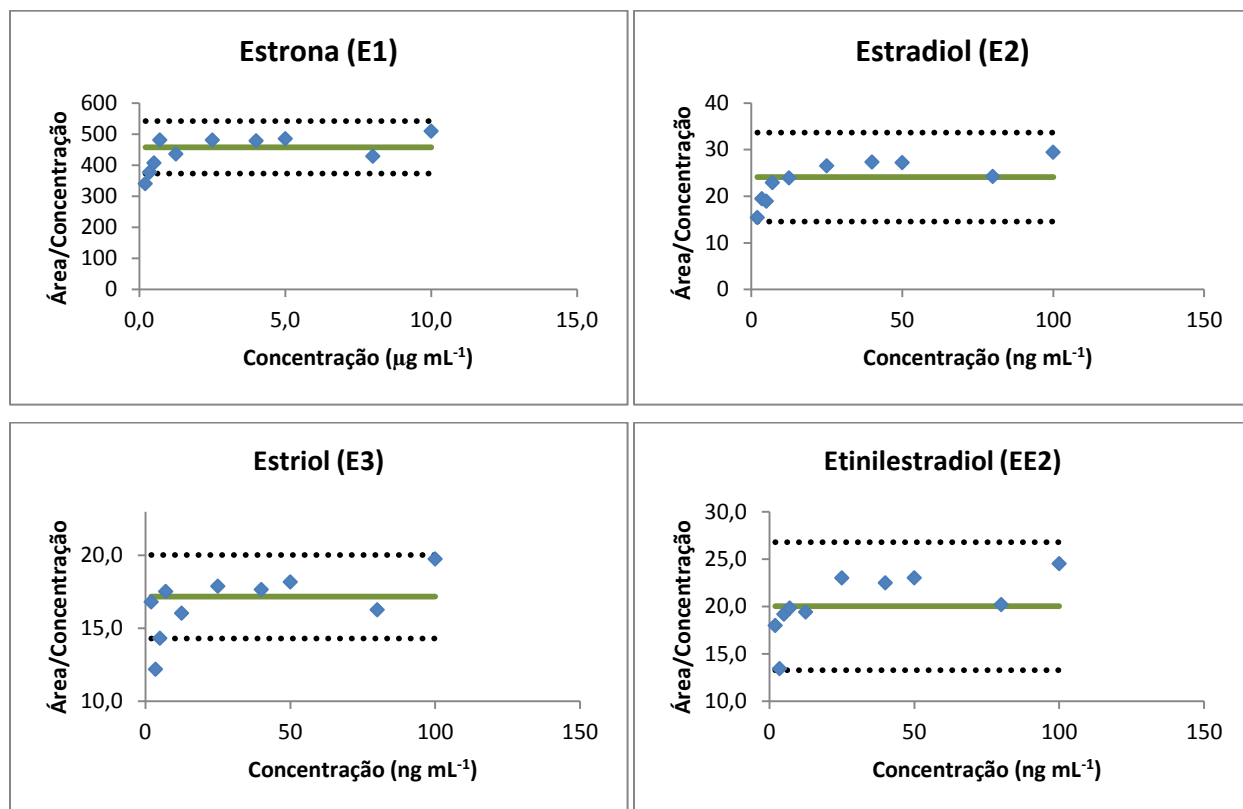
**Figura II.6.** Cromatogramas (HPLC/UV – em vermelho e HPLC/FLD- em azul) para soluções padrão dos estrógenos no modo de eluição isocrático. Condições cromatográficas descritas na Tabela II.2, página 52. Concentração intermediária da curva analítica (Ponto 5 – Tabela II.4)

Dessa forma, as análises de amostras ambientais (Fev/2013 e Set/2013) apresentadas no Capítulo III foram realizadas com detecção simultânea por UV-FLD nas condições cromatográficas descritas na Tabela II.2 e, em uma mesma amostra, a quantificação de cada analito foi realizada no detector adequado.

#### 4.2. Avaliação da resposta do sistema cromatográfico

A Figura II.7 exemplifica a construção das curvas de linearidade preparadas em solvente (acetonitrila) e detecção por FLD.

De acordo com o teste de Huber, descrito na seção 3.3.1 (página 53), para o estriol, por exemplo, os pontos referentes às duas primeiras concentrações da linearidade não podem ser utilizados para construção da curva analítica, pois situaram-se fora do intervalo delimitado pelos limites superior e inferior.



**Figura II.7.** Gráficos de linearidade para os estrógenos (HPLC-FLD). Linha pontilhada: limites superior e inferior; linha contínua: mediana.

Durante o trabalho foram construídas curvas sempre que se procedia a uma análise, pois tratando-se de um detector espectrofotométrico, pressupõe-se que a resposta pode ser afetada pelas horas de uso da lâmpada. A Tabela II.5 apresenta os coeficientes da regressão linear da curva analítica e linearidade do intervalo de concentrações estudado, obtidos para cada estrógeno inserido neste estudo com detecção por fluorescência e ultravioleta.

**Tabela II.5.** Intervalo de resposta linear e coeficientes angular (a), linear (b) e de correlação (r) instrumentais para análise com detecção por fluorescência e ultravioleta.

<b>Fluorescência*</b>				
	<b>Intervalo linear</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>r</b>
E1	0,35 – 10,0	492,5102	-39,5157	0,9992
E2	2,0 – 100,0	27,8393	-33,2662	0,9997
E3	5,0 – 100,0	18,4271	-14,4462	0,9991
EE2	3,5 – 100,0	23,6151	-28,3565	0,9990
<b>Ultravioleta**</b>				
	<b>Intervalo linear</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>r</b>
E1	1,0 – 20,0	164,8446	-5,6641	0,9996
E2	0,5 – 20,0	150,7620	15,9839	0,9997
E3	0,5 – 20,0	124,2655	-14,2325	0,9995
EE2	0,5 – 20,0	161,2957	-7,1839	0,9997

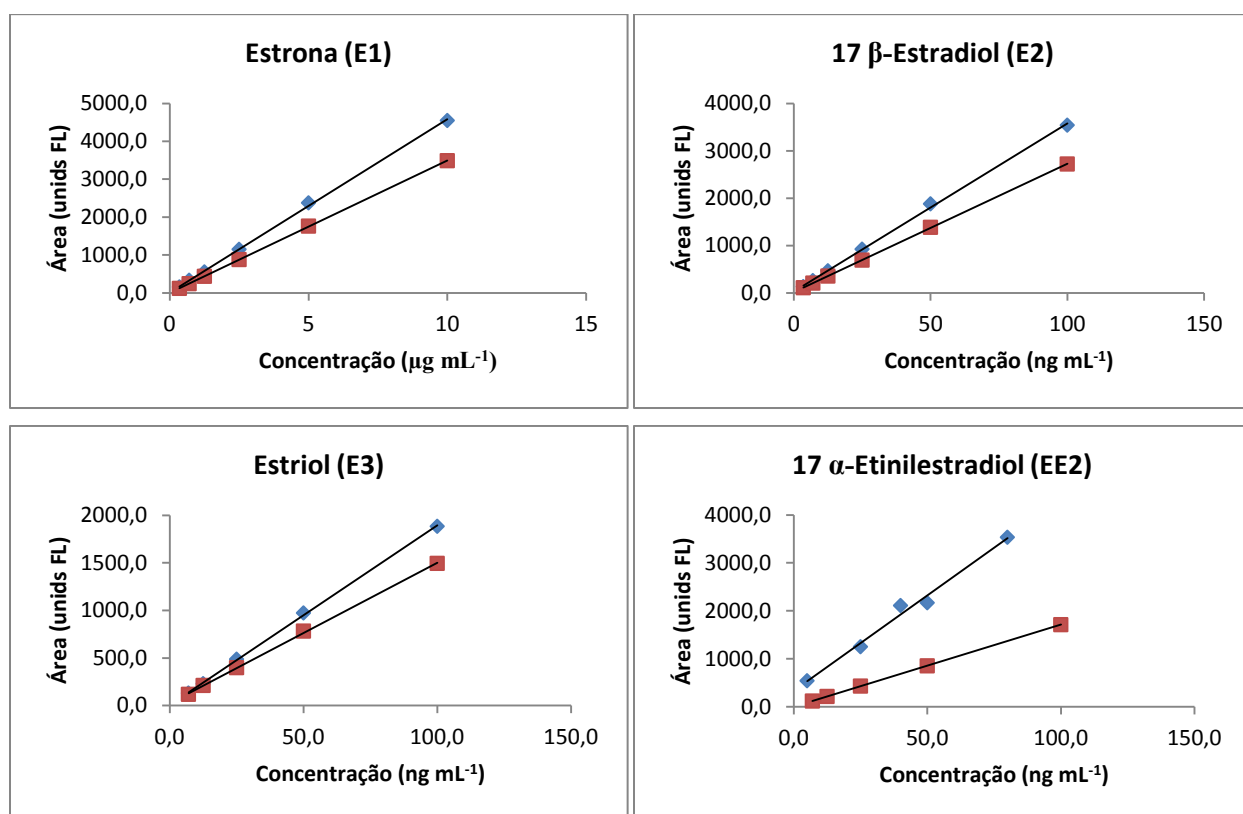
\*Valores expressos em ng mL<sup>-1</sup>, exceto E1 (µg mL<sup>-1</sup>). \*\* Valores expressos em µg mL<sup>-1</sup>

As curvas foram construídas e injetadas no mesmo dia para eliminação de eventuais erros inerentes ao equipamento ou estocagem das soluções de trabalho. Os coeficientes de correlação obtidos dessas curvas analíticas foram considerados aceitáveis de acordo com o preconizado pelo INMETRO (2010) e ANVISA (2012) que estabeleceram como requisito, nesta ordem, o coeficiente ser igual a 0,90 e superior a 0,99.

Devido à mudança no modo de eluição (gradiente para isocrática) avaliou-se a robustez da resposta cromatográfica, entre os métodos, comparando as sensibilidades (coeficientes angulares). A variação da sensibilidade das respostas analíticas de cada analito obtidas para os modos de eluição gradiente e isocrático, estimadas em termos de diferença percentual são apresentadas na Tabela II.6. Os valores sugerem elevada similaridade entre os modos de eluição, o que permite concluir a aplicabilidade do novo método sem prejuízos na resposta analítica.

**Tabela II.6.** Comparação entre os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas para análise em modo isocrático e gradiente, com detecção por fluorescência e ultravioleta.

	Fluorescência (FLD)			Ultravioleta (UV)		
	gradiente	isocrático	diferença (%)	gradiente	isocrático	diferença (%)
Estrona	460,34	485,07	5	168,22	169,83	0,9
17 $\beta$ -Estradiol	28,528	27,987	2	155,43	164,24	5
Estriol	16,926	18,735	9	141,23	135,4	4
17 $\alpha$ -Etinilestradiol	23,094	23,256	0,7	161,12	161,7	0,3



**Figura II.8.** Curvas analíticas em acetonitrila obtidas nos meses de Fevereiro/2013 (em azul) e Setembro/2013 (em vermelho) com detecção por FLD.

Como a resposta dos detectores espectrofotométricos pode mudar, de acordo com o tempo de uso das lâmpadas, foram construídas curvas analíticas das soluções padrão em solvente, nas duas épocas de amostragem. A Figura II.8 apresenta as

curvas analíticas, sendo possível notar considerável redução do sinal analítico representadas por valores de área menor.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) instrumentais determinados conforme descrito na seção 3.3.2 estão compilados na Tabela II.7.

**Tabela II.7.** Limites de detecção e quantificação instrumentais, obtidos para o sistema HPLC-FLD/UV utilizado neste trabalho.

Analitos	Fluorescência (FLD)		Ultravioleta (UV)	
	ng mL <sup>-1</sup>		µg mL <sup>-1</sup>	
	LD	LQ	LD	LQ
Estrona	0,3*	0,5*	0,6	0,8
17 β-Estradiol	2,0	3,0	0,4	0,5
Estriol	3,3	5,0	0,3	0,5
17 α-Etinilestradiol	3,5	5,1	0,2	0,4

\*Valores em µg mL<sup>-1</sup>

### 4.3. Otimização e validação de métodos

Os ensaios de exatidão e precisão do método foram realizados utilizando amostras fortificadas com os analitos e para que essa fortificação fosse bem sucedida manteve-se a amostra enriquecida com as substâncias a determinar, por um período determinado, antes da análise para permitir que o equilíbrio fosse alcançado.

#### 4.3.1. Água superficial

Durante todo o processo de extração em fase sólida a vazão foi controlada pela intensidade do vácuo do Manifold, principalmente na passagem da amostra pelo cartucho e na etapa de eluição dos analitos, para garantir a repetibilidade do método.

Para avaliar a eficiência do método de extração foram realizados ensaios em triplicata com amostras fortificadas (5,0 ng mL<sup>-1</sup> para a E1 e 0,05 ng mL<sup>-1</sup> para E2, E3 e EE2). Os valores médios das áreas obtidas no ensaio de recuperação, para cada analito, foram comparados às áreas do ponto da curva analítica correspondente, preparado no extrato da matriz. O desempenho do método foi avaliado com a amostra sem acidificação (pH ~ 7) e acidificada a pH 3 pela adição de ácido acético.

As recuperações obtidas para a amostra sem adição do ácido foram superiores a 100% o que indica a presença de coextrativos, que potencializam o sinal analítico e aumentam a porcentagem de recuperação. Com a acidificação a recuperação é melhorada provavelmente porque em pH 7 os coextrativos com grupamentos protonáveis estavam na forma não protonada e portanto menos polar, sendo retidos na fase polimérica (SPE) e retirados dela pelo eluente orgânico. Em pH 3 estas moléculas seriam protonadas e então eluidas com a água da amostra (Tabela II.8).

**Tabela II.8.** Valores de recuperação e coeficiente de variação (CV) obtidos para o método de extração SPE para água superficial (n = 9).

Analitos	Sem ácido (pH ~ 7)	
	% recuperação média	CV (%)
Estrona (E1)	157	21
17 $\beta$ -estradiol (E2)	119	14
Estriol (E3)	133	17
17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2)	129	26
Analitos	Com ácido (pH 3)	
	% recuperação média	CV (%)
Estrona (E1)	107	3
17 $\beta$ -estradiol (E2)	99	3
Estriol (E3)	99	6
17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2)	108	7

Na validação do desempenho do método, em termos de recuperação, foram utilizados ensaios de fortificação de amostras testemunhas de água de rio em três níveis (Tabela II.9), em uma série de três replicatas para cada nível, utilizando-se o método proposto com a adição de ácido. Os níveis de fortificação foram escolhidos levando-se em consideração as concentrações médias de estrógenos encontradas em amostras ambientais, de acordo com o descrito na literatura (Huang et al., 2013; Li et al., 2012), bem como a detectabilidade do detector de fluorescência utilizado nesse trabalho.

**Tabela II.9.** Resultados de recuperação média ( $n = 9$ )  $\pm$  desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) do procedimento para extração dos estrógenos em amostra de água superficial em três níveis de concentração.

Analitos	Nível de fortificação	Recuperação média (%)	CV (%)
	(ng mL <sup>-1</sup> )	$\pm$ desvio padrão	
Estrona (E1)	1,0	74 $\pm$ 9	12
	5,0	90 $\pm$ 1	1
	10,0	93 $\pm$ 3	4
17 $\beta$ -Estradiol (E2)	0,01	104 $\pm$ 17	16
	0,05	81 $\pm$ 5	6
	0,1	91 $\pm$ 1	1
Estriol (E3)	0,01	107 $\pm$ 8	7
	0,05	108 $\pm$ 5	4
	0,1	81 $\pm$ 18	20
17 $\alpha$ -Etinilestradiol (EE2)	0,01	112 $\pm$ 22	20
	0,05	91 $\pm$ 1	2
	0,1	82 $\pm$ 2	2

Os valores obtidos para recuperação do método indicam que o mesmo é adequado ao estudo pretendido, sendo o mesmo rápido, preciso, exato, consome pequena quantidade solvente e, quando comparado aos métodos de extração comumente descritos na literatura com a utilização de cartucho Oasis (Waters) é sem dúvida mais barato, uma vez que o cartucho Strata-X (Phenomenex) custa três vezes menos que o Oasis.

A determinação dos limites de detecção e quantificação (Tabela II.10) foi realizada durante a validação do método através da análise de amostras testemunha em sete replicatas, seguindo o recomendado por Ribeiro e colaboradores (2008), conforme detalhado na seção 3.3.2. Considerando a possível variação na resposta analítica com o tempo, novos limites foram calculados para cada mês de coleta e comparados por teste t (Ver Apêndice A). Não foi evidenciada diferença significativa entre os valores e, portanto foram utilizados os limites da validação para quantificação dos analitos.

**Tabela II.10.** Limites de detecção e quantificação do método para extração de estrógenos em água superficial. Valores expressos em  $\text{ng mL}^{-1}$  (FLD e UV).

Analitos	Fluorescência (FLD)		Ultravioleta (UV)	
	LD	LQ	LD	LQ
Estrona	1,2	1,7	0,5	0,7
17 $\beta$ -Estradiol	0,02	0,03	0,4	0,6
Estriol	0,009	0,013	1,8	2,6
17 $\alpha$ -Etinilestradiol	0,06	0,09	0,5	0,7

### 4.3.2. Sedimento

A caracterização da amostra testemunha de sedimento (Ver Apêndice B), utilizada nos experimentos de otimização e validação, apresentou baixos teores de argila (13,7%) e de matéria orgânica (12,9%), o que pode indicar que este sedimento tenha baixa capacidade de sorver contaminantes orgânicos, como os estrógenos.

#### 4.3.2.1. Extração por ultrassom (USE)

Inicialmente testou-se o procedimento de extração por ultrassom baseado no método previamente descrito por Ternes (2002). Neste trabalho, diversas condições (solventes de extração e *clean up* com cartuchos SPE  $C_{18}$ , Florisil, OPT e Strata-X), foram avaliadas quanto à eficiência de extração em termos de recuperação dos analitos. Porém, nenhum dos métodos avaliados apresentou exatidão e precisão adequadas.

Uma vez que os experimentos USE não se mostraram eficientes para extração dos analitos e o fato do método QuEChERS – otimizado em paralelo – ter apresentado melhor eficiência, a otimização, validação e avaliação do efeito matriz não foram realizadas para o método USE.

#### 4.3.2.2. Método QuEChERS

A utilização do método QuEChERS para extração de estrógenos em sedimento foi fundamentada no fato de que os estrógenos poderiam ser extraídos somente com

acetonitrila considerando sua seletividade e, principalmente pela possibilidade de se obter um método mais rápido, simples e barato.

No método proposto (Tabela II.11), utilizou-se massa de amostra menor que as descritas na literatura (KVÍCALOVÁ et al., 2012), o solvente extrator foi acidificado para garantir desorção dos analitos da matéria orgânica e a amina primária-secundária (PSA) utilizada na SPE-dispersiva foi combinada ao C<sub>18</sub>. Além disso, avaliou-se a possibilidade do uso do cartucho PSA 500 mg na etapa de *clean up* do extrato.

**Tabela II.11.** Comparação entre as etapas envolvidas no método QuEChERS original e o proposto neste trabalho.

	QuEChERS original*	QuEChERS proposto
Extração	10,0 g amostra	2,5 g amostra
	+	+
	10,0 mL MeCN	10,0 mL MeCN 0,1% H <sub>3</sub> CCOOH
Partição	4,0 g MgSO <sub>4</sub>	4,0 g MgSO <sub>4</sub>
	+	+
	1,0 g NaCl	1,0 g NaCl
<i>Clean up</i>	1,0 mL sobrenadante	5,0 mL sobrenadante
	+	+
	150 mg MgSO <sub>4</sub>	250 mg MgSO <sub>4</sub>
	+	+
	25 mg PSA	250 mg PSA

\*Anastasiades et al., 2003.

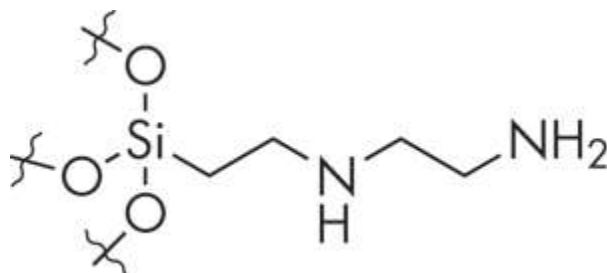
A menor quantidade de amostra comparada ao método original (10 g) foi importante para maximizar a área superficial e reduzir coextrativos da matriz melhorando a eficiência de extração.

Dos solventes que podem ser utilizados no método QuEChERS – acetona, acetato de etila e acetonitrila – optou-se por utilizar este último levando em consideração as prováveis interações  $\pi - \pi$  entre a insaturação do solvente e os anéis aromáticos dos analitos. Além disso, segundo Mastovská e Lehotay, (2004) a acetonitrila é mais eficiente, pois necessita apenas da adição dos sais para separar-se

facilmente da água e a transferência dos analitos para a fase orgânica é melhorada sem a necessidade da adição de co-solventes apolares que poderiam diluir o extrato (POUECH et al., 2012). Este solvente foi acidificado para tentar melhorar a eficiência da extração, considerando que os analitos pudessem estar fortemente adsorvidos na matéria orgânica do sedimento. A adição do ácido ao solvente extrator força a protonação dos analitos e da superfície negativa das substâncias húmicas, principal componente da matéria orgânica, liberando os estrógenos para a fase orgânica que será analisada, aumentando a eficiência da extração.

A adição dos sais NaCl e MgSO<sub>4</sub> durante a etapa de extração/partição, mantidas do método original, promove o efeito *salting out* promovendo a separação das fases orgânica e aquosa. Além disso, a hidratação do sulfato de magnésio é uma reação exotérmica com aquecimento entre 40 – 45°C, o que favorece a extração de compostos pouco polares, como os estrógenos (PRESTES et al., 2009).

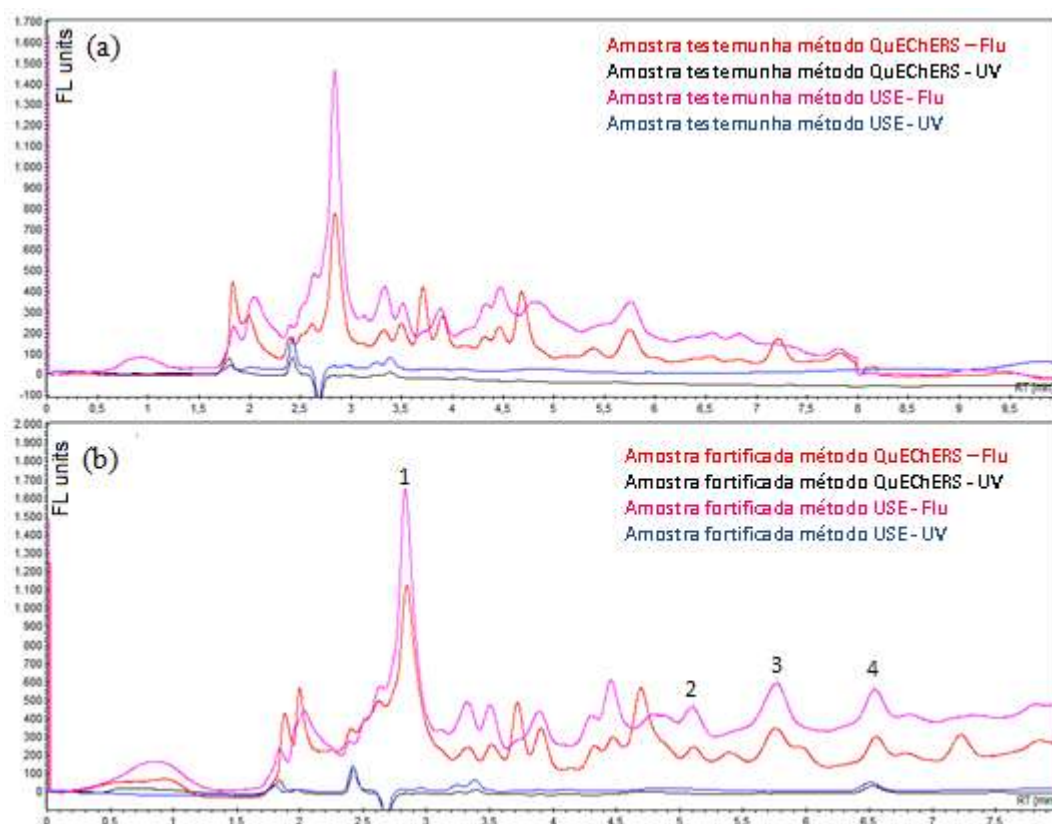
Após a etapa de extração/partição, a SPE dispersiva permite o *clean up* de maneira rápida e simples. A amina primária-secundária (PSA), característica da SPE dispersiva no QuEChERS, devido a sua estrutura bidentada com grupos amino primário e secundário (Figura II.9) retém fortemente compostos polares presentes na matriz. No método otimizado, optou-se pela combinação da PSA com o C<sub>18</sub> a fim de reter também substâncias menos polares da matriz e que pudessem interferir na análise e quantificação dos estrógenos. Além disso, testou-se a utilização do *clean up* com o cartucho contendo PSA no lugar da SPE dispersiva, comumente utilizada.



**Figura II.9.** Estrutura bidentada da amina primária secundária (PSA).

O método com SPE dispersiva foi bastante eficiente na extração dos analitos, além de resultar em um extrato sem interferentes da matriz, o que foi comprovado pelos valores de recuperação (63 – 83%) e coeficientes de variação dentro dos padrões recomendados ( $CV < 20\%$ ) (BRITO et al., 2003). Por outro lado, a utilização do cartucho PSA apresentou recuperações aceitáveis (68 – 116%), exceto para estriol (137%), porém os coeficientes de variação foram bastante elevados (18 – 87%). Como observado, o *clean up* utilizando PSA em cartucho apresentou aumento no CV possivelmente causado pela dificuldade em manter as mesmas condições de vazão entre um cartucho e outro, o que influencia diretamente na interação dos analitos em relação aos outros constituintes da matriz e ao sorvente. Na SPE dispersiva as condições envolvidas (tempo de contato e agitação) são mais homogêneas e facilmente controladas pelo analista, gerando valores de CV menores.

Na Figura II.10 apresenta-se um cromatograma obtido para o extrato da amostra de sedimento fortificada com  $2 \mu\text{g g}^{-1}$  para E1 e  $20 \text{ ng g}^{-1}$  para os demais, utilizando-se o método QuEChERS comparada ao cromatograma obtido para o método de extração sequencial por ultrassom.



**Figura II.10.** Cromatogramas das amostras testemunha (a) e fortificadas (b) de sedimento, submetidas aos métodos de extração estudados (USE e QuEChERS). Condições cromatográficas descritas na Tabela II.2, página 52. Concentração intermediária da curva analítica (Ponto 5 – Tabela II.4)

Embora os perfis cromatográficos dos dois métodos de extração estudados (USE e QuEChERS) sejam similares para as amostras testemunha e fortificada, o método USE não apresentou extractabilidade adequada. Portanto, optou-se por dar continuidade ao procedimento de otimização do processo de extração empregando-se o método QuEChERS, por ser mais simples e ambientalmente mais adequado, além de ter apresentado melhor recuperação e CV.

A avaliação da exatidão (ou recuperação) e precisão do método foi realizada por meio de ensaios de fortificação de amostras testemunhas do sedimento em três níveis (Tabela II.12), com três replicatas para cada nível.

**Tabela II.12.** Resultados de recuperação média ( $n = 9$ )  $\pm$  desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) do procedimento para extração dos estrógenos utilizando método QuEChERS em amostra de sedimento.

<b>Analitos</b>	<b>Nível de fortificação (ng g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Recuperação média (%) <math>\pm</math> desvio padrão</b>	<b>CV (%)</b>
Estrona (E1)*	0,8	139 $\pm$ 19	14
	2,0	99 $\pm$ 15	15
	4,0	92 $\pm$ 8	8
17 $\beta$ -Estradiol (E2)	8,0	80 $\pm$ 6	8
	20	96 $\pm$ 7	7
	40	72 $\pm$ 2	3
Estriol (E3)	8,0	113 $\pm$ 5	5
	20	118 $\pm$ 6	0,5
	40	103 $\pm$ 5	5
17 $\alpha$ -Etinilestradiol (EE2)	8,0	131 $\pm$ 14	11
	20	121 $\pm$ 11	9
	40	70 $\pm$ 5	8

\*em  $\mu\text{g g}^{-1}$

Os resultados revelam a eficiência da extração para os três níveis de fortificação com valores de recuperação entre 70 – 139% e coeficientes de variação entre 0,5 – 15%. Esses valores estão inseridos no limite aceitável para metodologias de extração em matrizes complexas (50 – 120%) estabelecido pela Diretiva 2002/657/EC indicando que a metodologia para extrair os compostos é altamente reprodutível. Apenas E1 e EE2 apresentaram valores de recuperação acima do valor máximo, no primeiro nível de fortificação.

Os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) estimados estão dispostos Tabela II.13.

**Tabela II.13.** Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método. Valores expressos em  $\text{ng g}^{-1}$ . Para estrona expresso em  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

Analitos	LD	LQ
Estrona	1,0	1,6
17 $\beta$ -Estradiol	21,2	31,5
Estriol	23,6	41,8
17 $\alpha$ -Etinilestradiol	28,5	42,7

A maioria dos estudos encontrados na literatura mostrou a presença de estrógenos em sedimentos superficiais com concentrações acima desses limites. Embora os limites do método proposto sejam mais elevados em comparação com os relatados na literatura para análise por LC-MS/MS, ainda são aplicáveis para a determinação de estrogénos em matrizes ambientais. Por exemplo, Bertin e colaboradores (2011) detectaram a presença dos quatro estrógenos em sedimentos do ecossistema marinho no centro-sul do Chile com concentrações médias entre 0,01 – 53,21  $\text{ng g}^{-1}$ .

#### 4.3.3. Material particulado em suspensão

O procedimento de extração adotado para material particulado (MPS) foi inicialmente baseado no método de extração por ultrassom (USE) avaliado para amostras de sedimento, uma vez que essas partículas são sedimentos ressuspensos por organismos bentônicos, fenômenos naturais, tais como chuva e a hidrodinâmica local ou, ainda, por ação antrópica. Considerando uma menor quantidade de amostra para o MPS em relação ao sedimento, o método propõe que apenas agitação intensa do material particulado em agitador orbital (Vortex) seja capaz de extrair os analitos da matriz. Dessa forma, o procedimento de extração adotado para material particulado (MPS) foi baseado na agitação vigorosa e rápida do filtro contendo o MPS juntamente com o solvente extrator constituído pela mistura MeOH:ACN (50:50, v/v) seguida de centrifugação, secagem em fluxo de  $\text{N}_2$  e ressuspensão em 0,5 mL de acetonitrila, conforme representado na Figura II.4 da seção 3.8.

Os filtros com massa do material particulado entre 13 – 16 mg foram recortados em pedaços pequenos dentro de vial âmbar (40 mL) para fortificação (125  $\mu\text{g g}^{-1}$  para

E1 e 1250 ng g<sup>-1</sup> para E2, E3 e EE2) e posterior extração sequencial com 4,0 mL de metanol, 3,0 mL de acetona e 3,0 mL de acetonitrila, agitados vigorosamente em vortex durante 1 min. Avaliou-se a necessidade de *clean up* do extrato, comparando-se os cromatogramas/recuperações obtidos sem *clean up*, e *clean up* utilizando cartucho Strata-X e SPE-dispersiva (PSA + C<sub>18</sub>).

Assim como os demais, a eficiência do método foi avaliada com três replicatas de extração em termos de recuperação e coeficiente de variação (CV) com e sem utilização da etapa de *clean up*. Os resultados obtidos estão na Tabela II.14.

**Tabela II.14.** Valores de recuperação média (%) obtidos do procedimento para extração de estrógenos utilizando agitador vortex com e sem *clean up*.

Analitos	com <i>clean up</i> Strata-X		com <i>clean up</i> SPE dispersiva		sem <i>clean up</i> SPE	
	Rec (%)	CV (%)	Rec (%)	CV (%)	Rec (%)	CV (%)
E1	88	4	137	9	94	8
E2	71	17	147	11	92	10
E3	165	22	106	4	90	18
EE2	75	8	41	26	94	8

Os métodos com utilização do *clean up* não foram satisfatórios para todos os analitos. A utilização da SPE dispersiva extraiu com eficiência adequada apenas o estriol, enquanto com cartucho Strata-X a extração do mesmo não foi eficiente, com valor de recuperação e CV elevado. Entretanto, o método sem *clean up* mostrou-se eficiente para todos os analitos, com valores de recuperação entre 90 – 94% (CV < 18%). Esse comportamento pode estar diretamente relacionado com as etapas de manipulação da amostra; quanto maior o número de etapas envolvidas no processo, maior a dispersão dos resultados, refletidos no coeficiente de variação. Além disso, considerando que as recuperações obtidas nos experimentos são reflexos de ensaios independentes realizado naquele momento, para dada concentração específica (escolhida para o processo de otimização) atrelada ao fato de nessa etapa da validação busca-se respostas rápidas e pontuais, descartou-se os métodos que agregavam a etapa de limpeza do extrato. Isso não quer dizer que para outra

concentração esses valores de recuperação absoluta pudessem ser maiores ou menores, porém para a concentração avaliada não foi satisfatória. Dessa forma, infere-se a possibilidade de aplicar o método que exclui a etapa de *clean up* para amostras reais sem prejuízo para análise cromatográfica.

Considerando as coletas realizadas com variações sazonais e, partindo do pressuposto que a massa do material particulado retido seja diferente nestes períodos o método foi submetido à avaliação de robustez, uma vez que em época de seca a quantidade de MPS é menor devido a pequeno volume de precipitação e conseqüentemente menores efeitos de correntes. Para o mesmo, foram realizados testes variando as massas (4,0 mg e 8,0 mg) de acordo com a quantidade de filtro. Os valores de desempenho do método estão apresentados na Tabela II.15 e demonstram boa exatidão e precisão com valores dentro dos limites aceitáveis estabelecidos pela Diretiva 2002/657/EC.

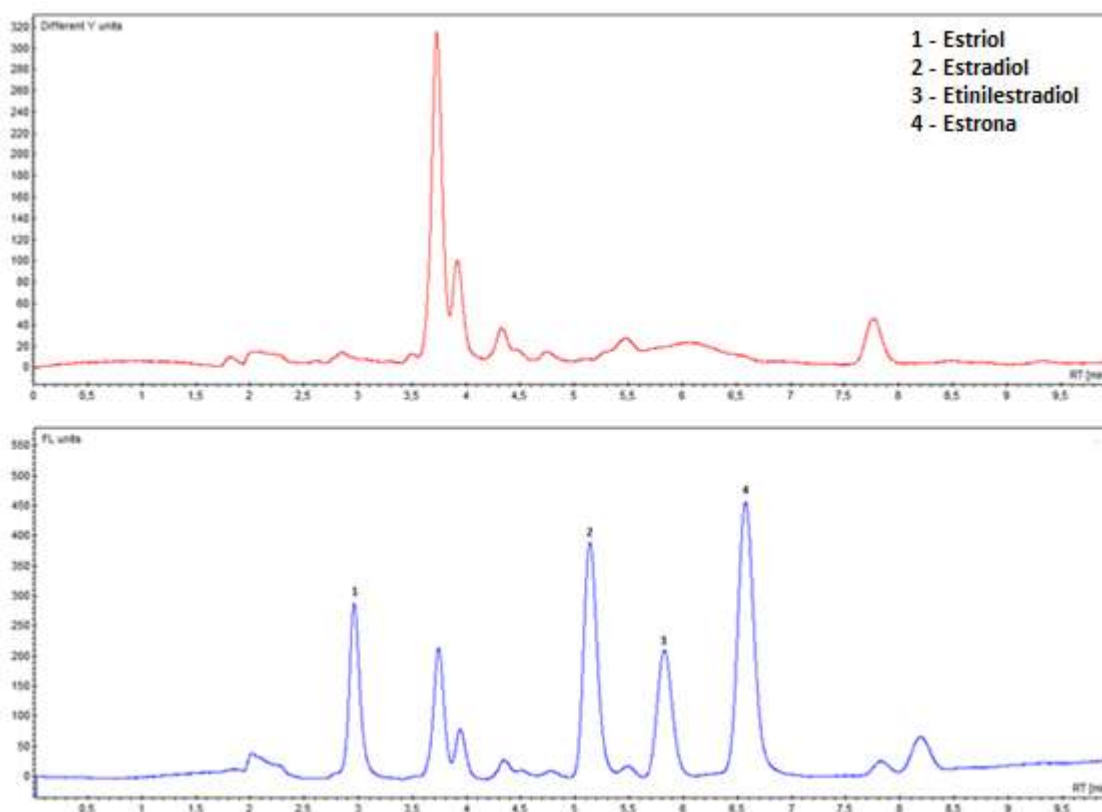
**Tabela II.15.** Valores de recuperação média (%) obtidos para o método utilizando massas e quantidade de filtros diferentes.

Analitos	1 filtro (~ 4 mg)		2 filtros (~ 8 mg)	
	Rec (%)	CV (%)	Rec (%)	CV (%)
E1	90	2	86	8
E2	99	8	86	6
E3	106	5	90	11
EE2	86	7	87	5

É possível notar que a variabilidade de massa e quantidade de filtro não altera a extractabilidade do método proposto evidenciando uma adequada robustez e repetibilidade. Isso significa que este pode ser aplicado para material particulado em suspensão coletado em épocas diferentes sem alteração do seu desempenho.

A Figura II.11 mostra os cromatogramas da amostra testemunha e amostra fortificada do material particulado em suspensão aquático. Os constituintes da matriz não interferem na identificação e quantificação dos estrógenos, o que já evidencia um

efeito matriz baixo podendo ser quantificados os estrógenos pela curva preparada no solvente.



**Figura II.11.** Cromatogramas (HPLC – FLD) das amostras testemunha (rosa) e fortificada (azul) do material particulado em suspensão. Condições cromatográficas descritas na Tabela II.2, página 52. Concentração intermediária da curva analítica (Ponto 5 – Tabela II.4).

O processo de validação do método foi executado seguindo exatamente o protocolo utilizado para amostras de água e sedimento. Da mesma forma, as amostras fortificadas foram submetidas ao procedimento de extração, purificação e concentração otimizado, sendo posteriormente analisadas no sistema cromatográfico e o cálculo dos valores médio de recuperação foram efetuados considerando as áreas do ponto correspondente preparada no extrato da matriz. Esses valores estão dispostos na Tabela II.16.

**Tabela II.16.** Resultados de recuperação média ( $n = 9$ )  $\pm$  desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) do procedimento para extração dos estrógenos em amostra de material particulado em suspensão.

Analitos	Nível de fortificação ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Recuperação média (%) $\pm$ desvio padrão	CV (%)
Estrona (E1)*	50	$72 \pm 6$	8
	250	$90 \pm 6$	6
	500	$92 \pm 2$	2
17 $\beta$ -Estradiol (E2)	500	$112 \pm 11$	10
	2500	$94 \pm 3$	4
	5000	$88 \pm 3$	3
Estriol (E3)	500	$60 \pm 3$	6
	2500	$87 \pm 4$	5
	5000	$91 \pm 1$	1
17 $\alpha$ -Ethinilestradiol (EE2)	500	$64 \pm 4$	6
	2500	$98 \pm 7$	8
	5000	$92 \pm 3$	3

\* $\mu\text{g g}^{-1}$

O método pode ser considerado confiável dentro dos parâmetros de validação podendo ser aplicado nessas amostras ambientais. Embora o estriol (E3) e 17  $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) tenham apresentado em torno de 60% de recuperação da concentração dos analitos adicionados na fortificação, os valores de coeficiente de variação estão bem abaixo do limite estabelecido, 20%.

Para o cálculo dos limites foram considerados a massa do material particulado retido no filtro e o volume do extrato concentrado. Os valores obtidos para os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) encontram-se na Tabela II.17.

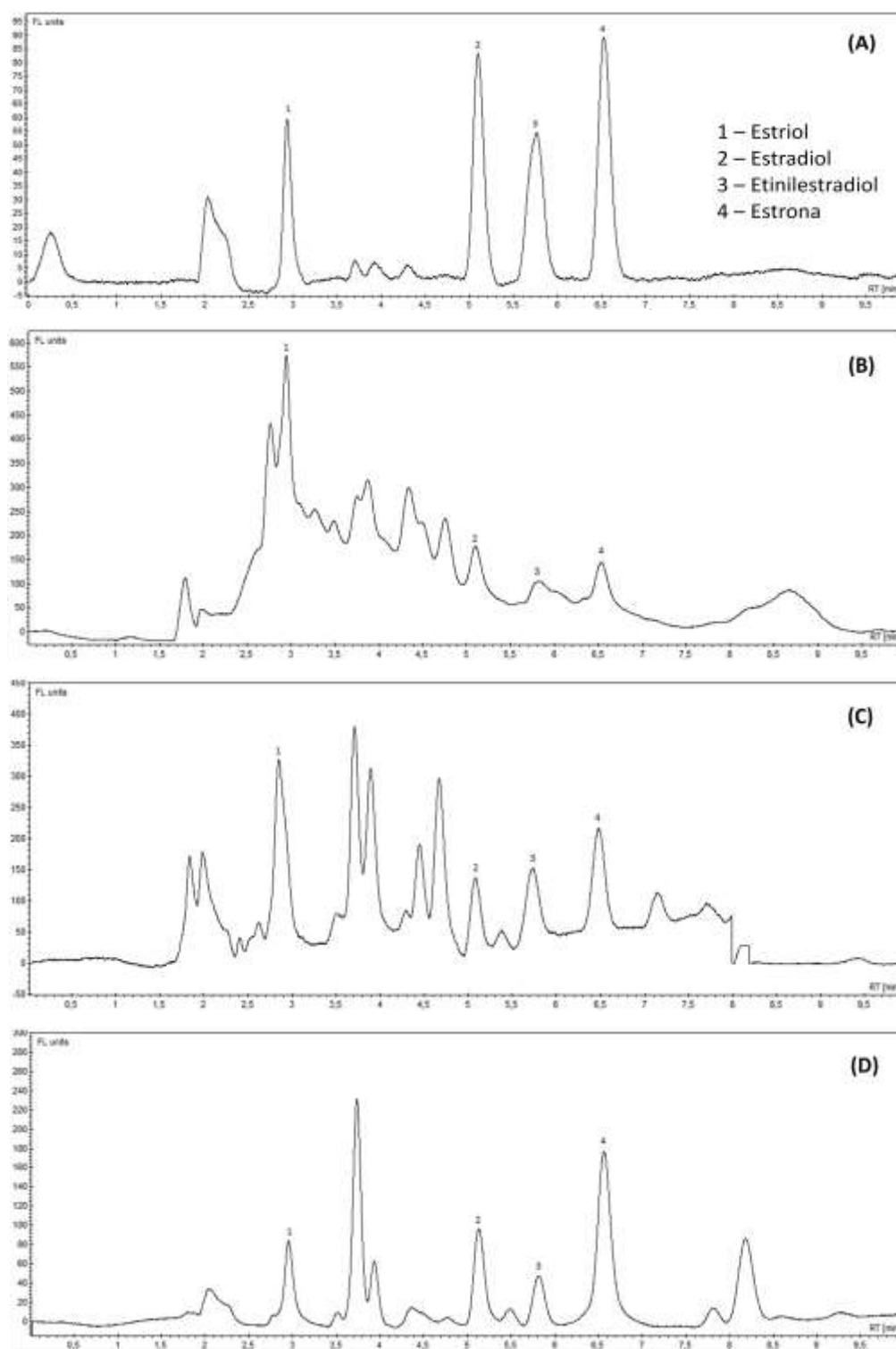
**Tabela II.17.** Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método para extração dos estrógenos em material particulado. Valores expressos em  $\text{ng g}^{-1}$  (FLD) e em  $\mu\text{g g}^{-1}$  (UV).

Analitos	Fluorescência (FLD)		Ultravioleta (UV)	
	LD	LQ	LD	LQ
Estrona	290*	450*	130	200
17 $\beta$ -Estradiol	410	600	90	130
Estriol	460	700	160	230
17 $\alpha$ -Etinilestradiol	430	630	110	160

\* $\mu\text{g g}^{-1}$

#### 4.4. Avaliação do efeito matriz sobre a resposta do sistema analítico

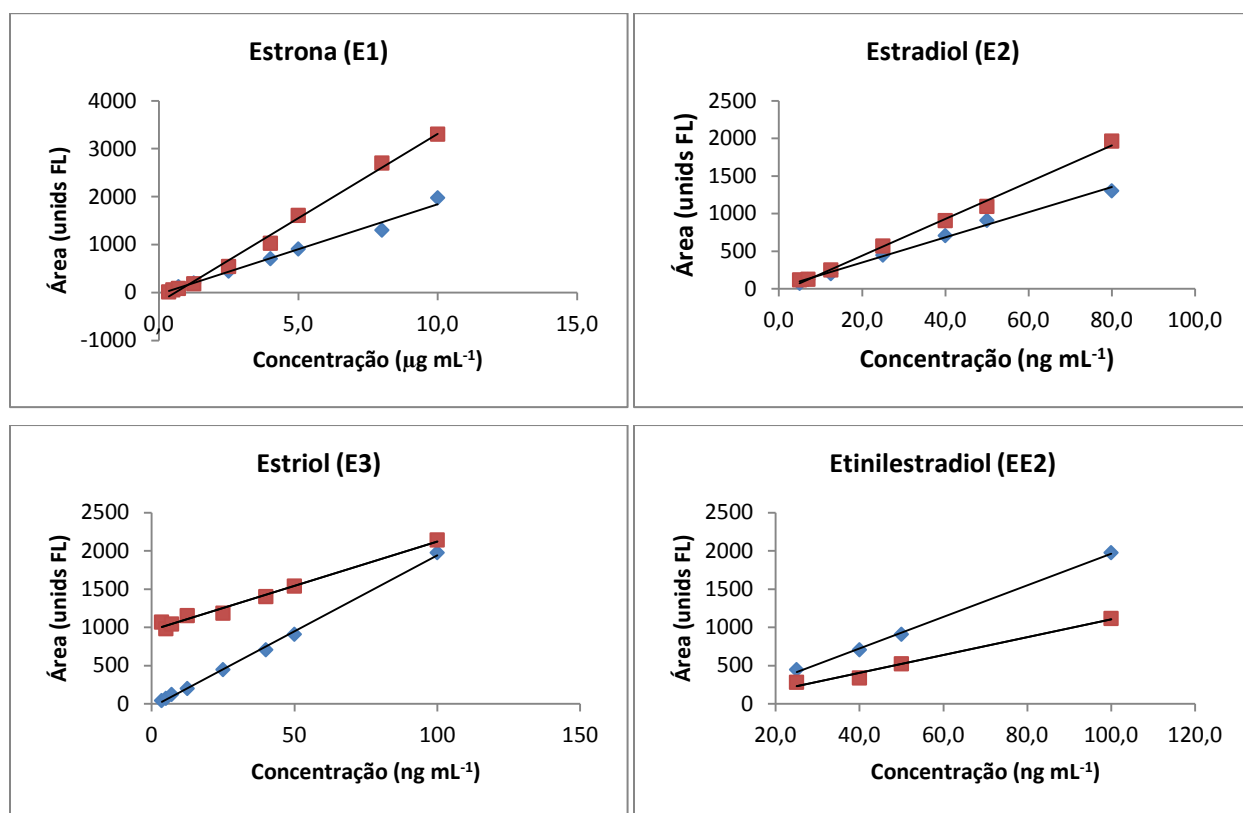
Para avaliação do comportamento dos padrões em solvente e no extrato das matrizes ambientais (água superficial, sedimento e material particulado), amostras testemunha de cada matriz foram submetidas ao processo de extração, porém a ressuspensão do extrato seco foi realizada com a solução dos padrões preparadas em solvente e em diferentes concentrações. A Figura II.12 apresenta os cromatogramas de um nível dentro da faixa de trabalho, utilizados na otimização dos métodos.



**Figura II.12.** Cromatogramas (HPLC-FLD) obtidos na análise do efeito induzido pela matriz para (A) padrões dos estrógenos em solvente (acetonitrila) e nos extratos de (B) água superficial, (C) sedimento e (D) material particulado em suspensão. Cromatogramas obtidos para as concentrações da validação.

#### 4.4.1. Água superficial

Para análise do efeito induzido pela matriz em água de rio foram utilizados dez pontos da curva de calibração do sistema analítico. Na Figura II.13 estão apresentadas as curvas analíticas sobrepostas obtidas para cada analito em solvente e no extrato da matriz. Nelas, é possível notar superestimação do sinal analítico para todas as substâncias, exceto para 17  $\alpha$ -etinilestradiol.



**Figura II.13.** Curvas analíticas obtidas em solvente acetonitrila e na **matriz água de rio** detecção por FLU. Azul – curva no solvente; Vermelho – curva na matriz.

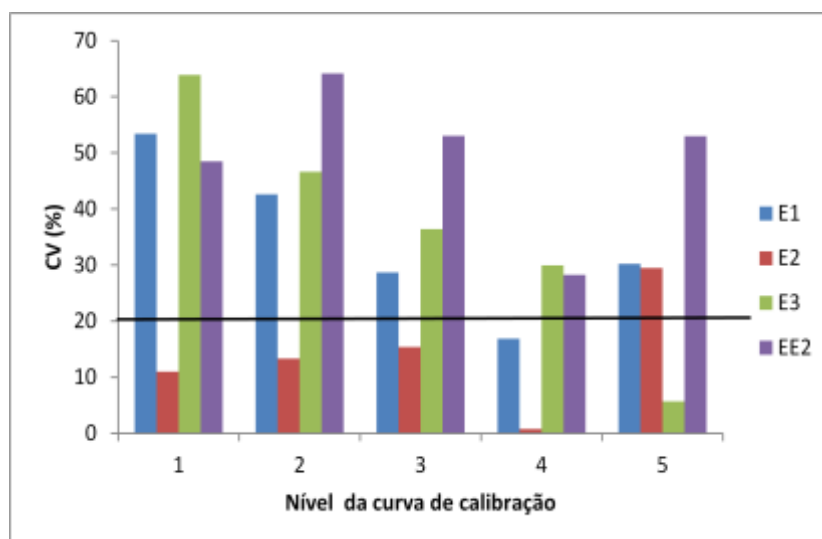
De acordo com a comparação dos coeficientes angulares (sensibilidade) das curvas (Método 1, seção 3.3.4), apenas o E2 não apresenta nenhuma diferença significativa (superior a 10%), enquanto que os resultados obtidos para os demais analitos indicam que a resposta é afetada pelo efeito da matriz. Para E3 e EE2 os componentes da matriz geram uma redução acima de 40% da sensibilidade enquanto que para a E1 esse efeito causa um aumento de aproximadamente 90%. A similaridade

entre os valores de inclinação da curva de calibração foi avaliada estatisticamente através do teste t de Student e teste F de Snedecor pela comparação das variâncias (Tabela II.18).

**Tabela II.18.** Resultados da porcentagem de efeito matriz e análise estatística para matriz água.

Analitos	% efeito matriz	Teste F	Teste t	Conclusão
Estrona	87	$F_{cal} > F_{tab}$	$t_{calc} > t_{tab}$	HÁ EFEITO
Estradiol	3,4	$F_{cal} < F_{tab}$	$t_{calc} < t_{tab}$	NÃO HÁ EFEITO
Estriol	- 41	$F_{cal} > F_{tab}$	$t_{calc} > t_{tab}$	HÁ EFEITO
Etinilestradiol	- 43	$F_{cal} > F_{tab}$	$t_{calc} > t_{tab}$	HÁ EFEITO

Aplicando-se o Método 2 descrito na seção 3.3.4 em que comparam-se os coeficientes de variação ponto a ponto da curva de calibração observa-se efeito matriz em todas as concentrações e, apesar de não ter sido observado efeito matriz significativo para E2 através da comparação entre os coeficientes angulares das curvas geradas, para este analito o efeito aparece na concentração mais elevada do intervalo linear onde o CV apresentou-se maior que 20% (Figura II.14). Esse teste foi aplicado para os cinco pontos em que todos os estrógenos respondiam satisfatoriamente, uma vez que sua detectabilidade e respostas cromatográficas são diferentes.

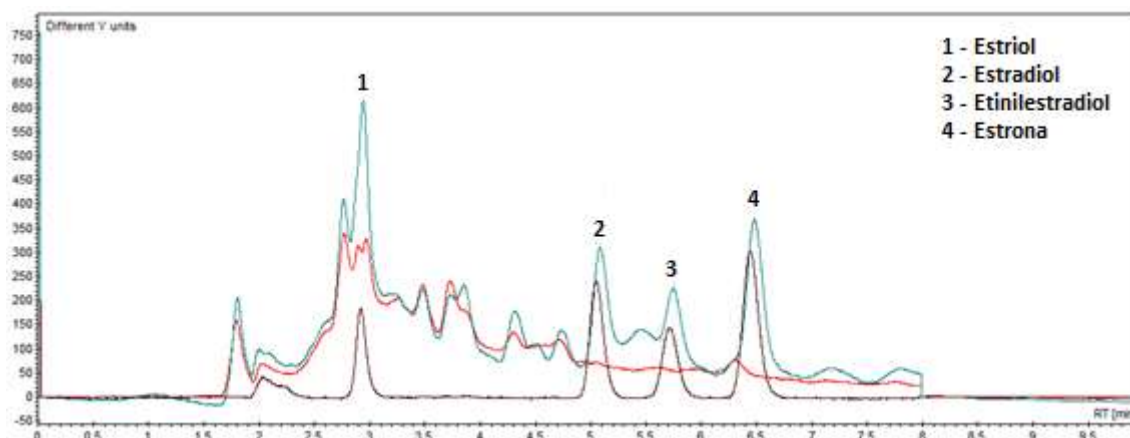


**Figura II.14.** Coeficientes de variação (CV) obtidos para as análises dos padrões em solvente acetonitrila e no extrato da matriz água. Linha em destaque corresponde ao valor de CV igual a 20%.

Dessa forma, a quantificação desses analitos deve ser realizada pela curva preparada no extrato da matriz, uma vez que a resposta dos padrões foi estatisticamente diferente entre as curvas, demonstrando a presença de efeito matriz significativo.

Neste trabalho, embora não detectado efeito matriz significativo para E2 em amostras de água de rio, escolheu-se proceder à quantificação de todos os analitos, utilizando as curvas preparadas em extrato da matriz água.

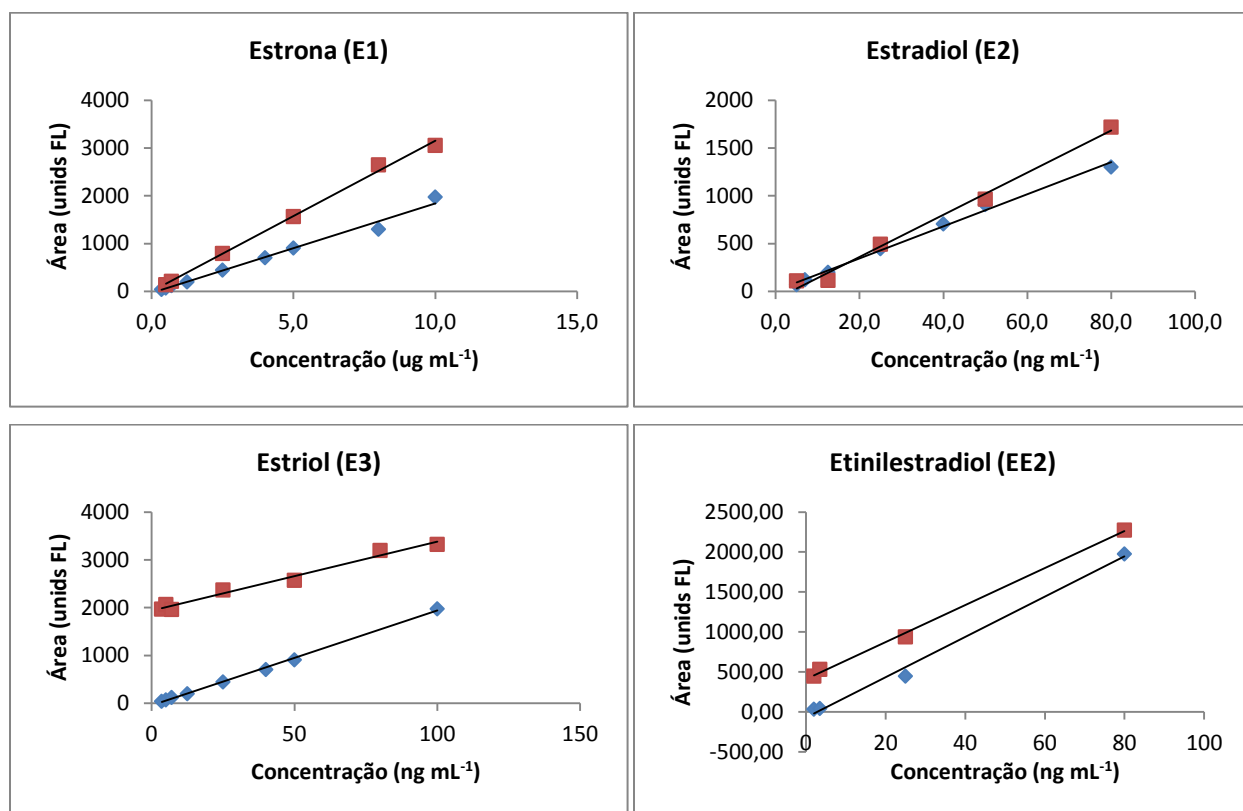
Finalmente, analisando a sobreposição dos cromatogramas (Figura II.15) das soluções padrão em solvente, no extrato da matriz e amostra testemunha, é possível afirmar que o efeito matriz observado deve-se a compostos que podem estar ligados ao analito por interações intermoleculares e não por coextrativos, uma vez que o cromatograma da amostra testemunha não apresenta picos eluídos no tempo de retenção dos analitos de interesse.



**Figura II.15.** Sobreposição dos cromatogramas (HPLC – FLD) das soluções preparadas em solvente acetonitrila (marrom), no extrato da **matriz água** (azul) e amostra testemunha (vermelha). As concentrações correspondem ao nível intermediário da validação (seção 4.3.1).

#### 4.4.2. Sedimento

O estudo de efeito matriz produzido pelo método QuEChERS em sedimento foi realizado a partir de dez pontos da curva de calibração adicionados ao extrato da matriz, como descrito na seção 3.3.4. As curvas analíticas e análise estatística estão representadas na Figura II.16 (curvas) e Tabela II.19 (análise estatística), as quais demonstram um aumento na resposta do sinal analítico para todos os estrógenos.



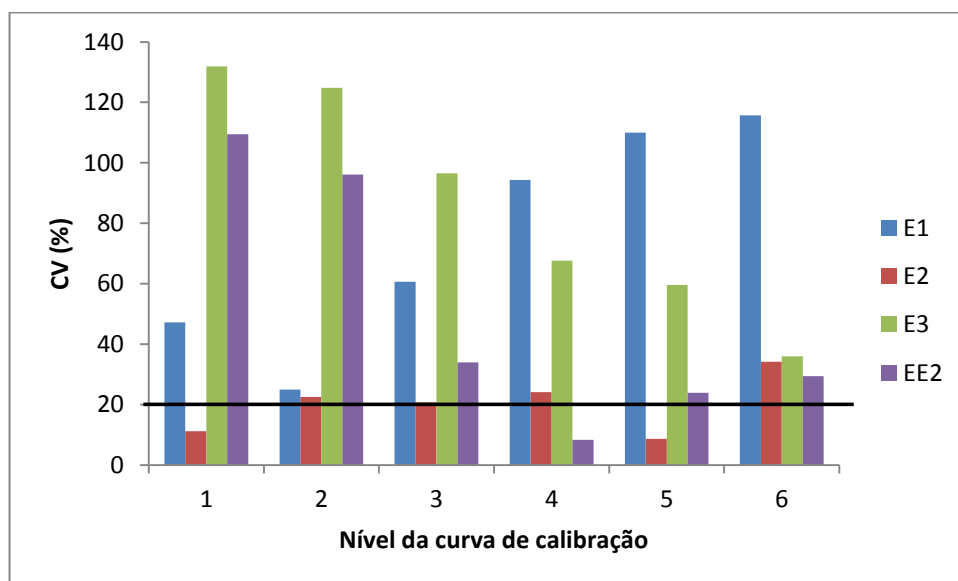
**Figura II.16.** Curvas analíticas da estrona, 17  $\beta$ -estradiol, estriol e 17  $\alpha$ -etinilestradiol obtidas em solvente acetonitrila e na **matriz sedimento** submetida ao processo de extração QuEChERS detecção por FLU. Azul – curva no solvente; Vermelho – curva na matriz.

Quanto à sensibilidade, o método QuEChERS provoca efeito matriz significativo para E1 e E3 com superestimação de 68% e 27% do sinal analítico, respectivamente. Para E2 e EE2 a influência da matriz foi insuficiente para provocar variação significativa. Pela avaliação estatística entre os valores de inclinação da curva de calibração através do teste t de Student e teste F de Snedecor também foi observado efeito somente para E1 e E3 (Tabela II.19). Esse efeito matriz pode ser atribuído à complexidade dessa matriz ambiental que é constituída por compostos orgânicos, inorgânicos, substâncias húmicas, não húmicas entre outros.

**Tabela II.19.** Resultados da porcentagem de efeito matriz e análise estatística para matriz sedimento.

Analitos	% efeito matriz	Teste F	Teste t	Conclusão
Estrona	68	$F_{cal} > F_{tab}$	$t_{calc} > t_{tab}$	HÁ EFEITO
Estradiol	- 8.0	$F_{cal} < F_{tab}$	$t_{calc} < t_{tab}$	NÃO HÁ EFEITO
Estriol	- 27	$F_{cal} > F_{tab}$	$t_{calc} > t_{tab}$	HÁ EFEITO
Etinilestradiol	- 8.0	$F_{cal} < F_{tab}$	$t_{calc} < t_{tab}$	NÃO HÁ EFEITO

A influência significativa da matriz para E1 e E3 foi comprovada pela análise do CV (%) ponto a ponto da curva de calibração, principalmente em concentrações mais elevadas em detrimento das mais baixas. Entretanto, para E2 e EE2 pode-se constatar esse efeito na maior parte das concentrações testadas (Figura II.17). Para o EE2 em especial, o efeito foi mais pronunciado para as menores concentrações do intervalo linear, que muitas vezes correspondem aos valores encontrados no ambiente.

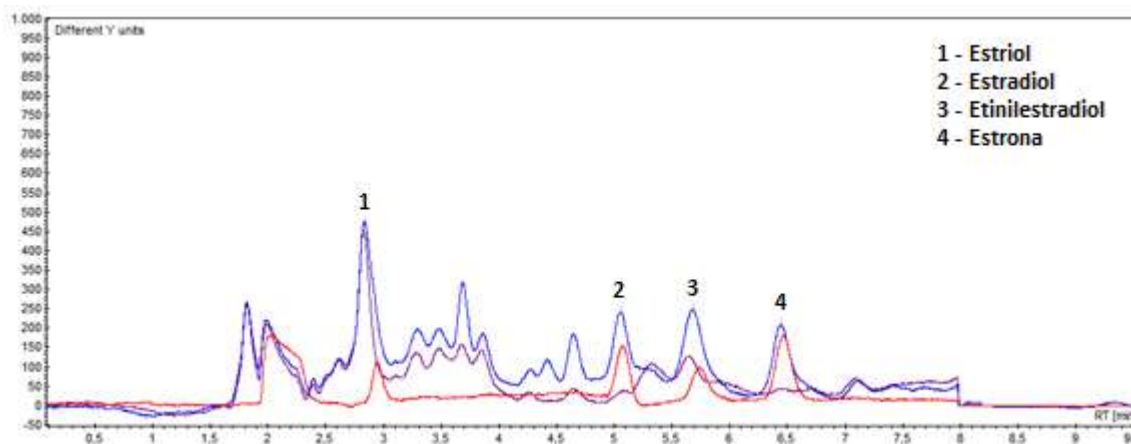


**Figura II.17.** Coeficientes de variação (CV) obtidos para as análises dos padrões em solvente acetonitrila e no extrato da matriz sedimento. Linha em destaque corresponde ao valor de CV igual a 20%.

Dessa forma, apesar de detectado efeito matriz significativo para E1 e E3 apenas, a quantificação de todos analitos deve ser realizada pela curva preparada no

extrato da matriz sedimento uma vez que o efeito foi comprovado para a maioria das concentrações quando submetidas à comparação ponto a ponto.

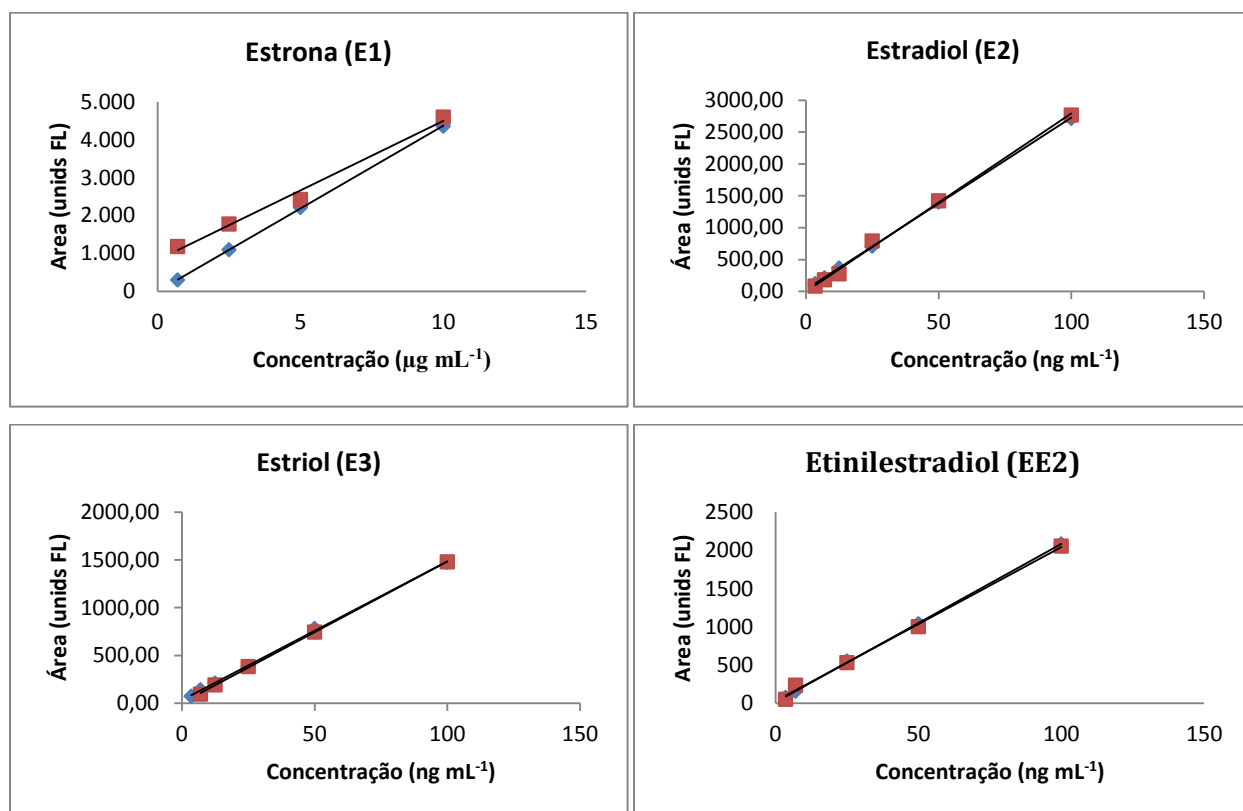
Observando os cromatogramas das soluções preparadas no solvente, no extrato da matriz e amostra testemunha (Figura II.18) nota-se ausência de coextrativos da matriz que influenciem grandemente a resposta do sistema cromatográfico ou atrapalhem a quantificação dos mesmos, exceto para o E3 e EE2. Porém, essa influência é excluída quando a quantificação é feita pelo ponto preparado no extrato da matriz. Assim como para água superficial, o efeito matriz pode estar relacionado também a compostos que estão interagindo por forças intermoleculares.



**Figura II.18.** Sobreposição dos cromatogramas (HPLC – FLD) das soluções preparadas em solvente acetonitrila (vermelho), no extrato da **matriz sedimento** (azul) e amostra testemunha (roxo). As concentrações correspondem ao nível intermediário da validação (seção 4.3.2).

#### 4.4.3. Material particulado em suspensão (MPS)

O efeito induzido pela matriz também foi avaliado para material particulado em suspensão aquático seguindo os mesmos procedimentos utilizados para água e sedimento, a partir de cinco pontos da curva de calibração. Na Figura II.19 estão apresentadas as curvas analíticas obtidas para cada analito em solvente e no extrato da matriz material particulado em suspensão. Visualmente já é possível notar, para três dos estrógenos em análise, ausência do efeito induzido pela matriz o que foi comprovado pelas análises estatísticas.

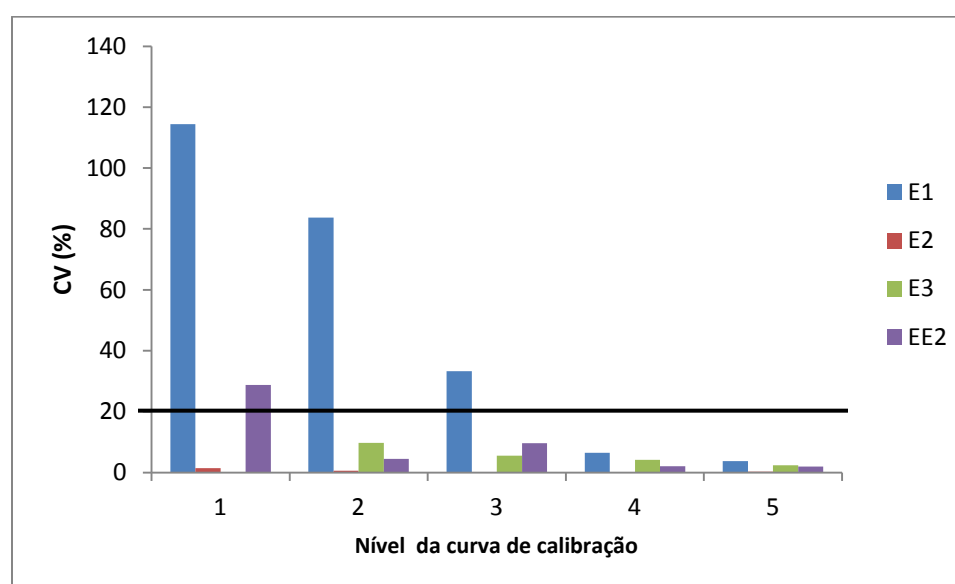


**Figura II.19.** Curvas analíticas da estrona, 17  $\beta$ -estradiol, estriol e 17  $\alpha$ -etinilestradiol obtidas em solvente acetonitrila e na **matriz material particulado em suspensão** detecção por FLU. Azul – curva no solvente; Vermelho – curva na matriz.

Pela comparação dos coeficientes angulares (sensibilidade) das curvas apenas o E1 apresenta diferença significativa superestimando a resposta em 16%, enquanto que os resultados obtidos para os demais confirmam a irrelevância do efeito da matriz também pela análise da similaridade estatística entre os valores de inclinação da curva de calibração. A tabela II.20 compila os dados estatísticos obtidos da comparação percentual entre os coeficientes angulares das curvas analíticas e testes t e F para avaliar similaridade entre os valores de inclinação da reta.

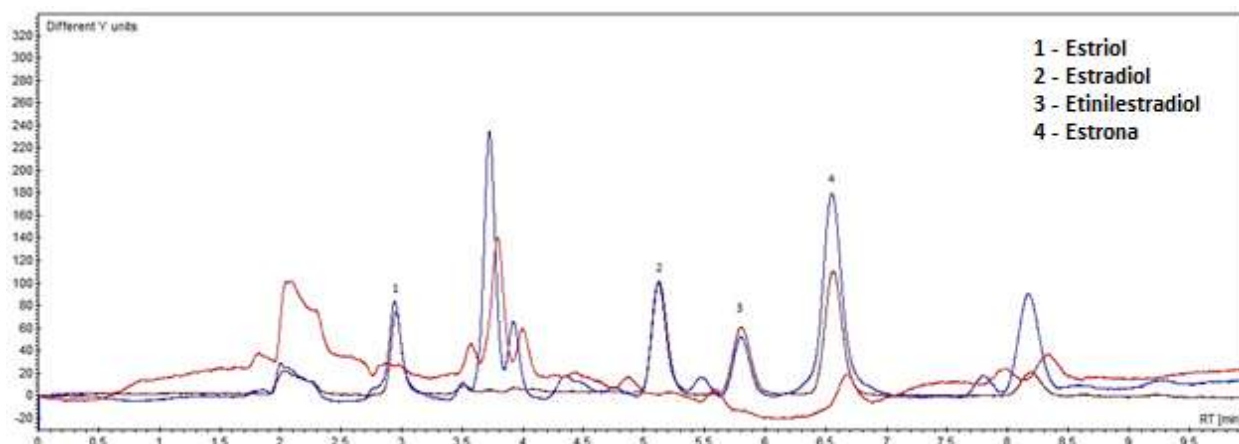
**Tabela II.20.** Resultados da porcentagem de efeito matriz e análise estatística para matriz material particulado em suspensão.

Analitos	% efeito matriz	Teste F	Teste t	Conclusão
Estrona	16	$F_{cal} > F_{tab}$	$t_{calc} > t_{tab}$	HÁ EFEITO
Estradiol	0,3	$F_{cal} < F_{tab}$	$t_{calc} < t_{tab}$	NÃO HÁ EFEITO
Estriol	0,1	$F_{cal} < F_{tab}$	$t_{calc} < t_{tab}$	NÃO HÁ EFEITO
Etinilestradiol	- 1,8	$F_{cal} < F_{tab}$	$t_{calc} < t_{tab}$	NÃO HÁ EFEITO



**Figura II.20.** Coeficientes de variação (CV) obtidos para as análises dos padrões em solvente acetonitrila e no extrato da matriz material particulado. Linha em destaque corresponde ao valor de CV igual a 20%.

Comparando-se os coeficientes de variação ponto a ponto da curva de calibração observa-se efeito matriz para E1 nas concentrações mais baixas e, apesar de não ter sido observado efeito matriz significativo para EE2, pode-se constatar o efeito na primeira concentração do intervalo linear (CV > 20%) (Figura II.20).



**Figura II.21.** Sobreposição dos cromatogramas (HPLC – FLD) das soluções preparadas em solvente acetonitrila (marrom), no extrato da **matriz material particulado** (azul) e amostra testemunha (vermelho). As concentrações correspondem ao nível intermediário da validação (seção 4.3.3).

Os cromatogramas sobrepostos (Figura II.21) das soluções padrão em solvente, no extrato da matriz e amostra testemunha evidencia um efeito matriz para E1 que pode ser atribuído a componentes da natureza da matriz ou do papel filtro utilizado na retenção da amostra. Já para o EE2 que apresentou um pequeno efeito quando em concentração baixa, isso pode estar ligado à presença de compostos ligados a matriz por interações intermoleculares, assim como acontece com as matrizes de água e sedimento.

## **Considerações do Capítulo II**

As condições cromatográficas de análise pré-estabelecidas foram satisfatoriamente otimizadas para incluir o estrógeno natural estriol (E3) e realizar detecção simultânea por ultravioleta e fluorescência sem afetar o desempenho do método.

Os métodos desenvolvidos para análise de estrógenos em matrizes de interesse ambiental – água superficial, sedimento e material particulado em suspensão – foram submetidos ao procedimento de validação que engloba parâmetros de confiabilidade analítica, incluindo o estudo da influência da matriz, que foi pronunciado para maior parte dos analitos em água e sedimento e, que pode ser atribuído a compostos ligados aos analitos. Em virtude da presença desse efeito, a quantificação dos analitos deverá ser realizada com base na curva preparada no extrato da matriz correspondente.

Para água, o método desenvolvido apesar de convencional substitui os cartuchos comumente utilizados por uma alternativa mais econômica com interações similares, o cartucho Strata-X. O método QuEChERS proposto para sedimentos, é uma proposta inédita na literatura para determinação de estrógenos e, em comparação com métodos convencionais reduz tempo, custo, e erros inerentes ao número de etapas envolvidas. Finalmente, para material particulado em suspensão aquático o método validado é robusto e eficiente podendo ser utilizado para quantificação dos mesmos em épocas diferentes, onde a massa de material em suspensão pode variar. Além disso, para material particulado em suspensão, não foram encontrados métodos descritos na literatura para determinação de estrógenos.

## **CAPÍTULO III**

**Ocorrência e distribuição de estrógenos no Rio Bauru  
e Ribeirão das Cruzes, ambos situados na Bacia  
Hidrográfica Tietê – Jacaré (UGRHI 13)**

## 1. Introdução

No ambiente aquático, os estrógenos podem adsorver a sedimento e material particulado em suspensão ou permanecer dissolvidos na coluna d'água. Embora a avaliação da distribuição de contaminantes no compartimento aquático seja indispensável para prever sua dinâmica ambiental, na literatura é menos comum o estudo com matrizes sólidas ambientais (SALVIA et al., 2012; MARTÍN et al., 2010; SENGUPTA et al., 2014), principalmente porque são mais complexas e necessitam de tratamento maior em relação à matriz líquida (MANSILHA et al., 2010; RAO et al., 2013).

No Brasil os estudos existentes incluem principalmente a análise de água superficial e potável como os trabalhos realizados por Jardim et al. (2012), Sodré et al. (2010) e Ghiselli (2007) na região de Campinas, bem como por Lopes et al. (2010) em Jaboticabal, ambas cidades do estado de São Paulo. Por outro lado, a avaliação da ocorrência de estrógenos em matrizes sólidas como sedimento e material particulado em suspensão ainda é exígua e inclui somente trabalhos desenvolvidos por Froehner et al. (2011 e 2012) que descrevem a ocorrência de estrógenos em sedimento de mangue no estado de Santa Catarina. Trabalhos envolvendo água, sedimento e material particulado em corpos hídricos brasileiros não foram encontrados na literatura sendo, este, portanto pioneiro para compreensão da distribuição desses estrógenos e avaliação do impacto ambiental.

Neste capítulo serão abordados aspectos da Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI) número 13 (Tietê/Jacaré), do estado de São Paulo, focando especificamente em dois dos maiores municípios desta UGRHI: Araraquara e Bauru, que apresentam características distintas em relação ao tratamento de esgoto sanitário. Serão aqui apresentados os resultados obtidos para a determinação de estrógenos em água e material particulado em suspensão, bem como a discussão dos mesmos em uma base amostral sazonal e espacial.

## **2. Revisão da Literatura**

### **2.1. Estrógenos: partição água/sedimento/material particulado**

A biodisponibilidade e partição desses contaminantes orgânicos hidrofóbicos no ambiente aquático é, em geral, controlada pela combinação de fatores como propriedades físico-químicas dos analitos e condições ambientais em que estão inseridos (AKKANEN et al., 2012). Devido à baixa solubilidade em água, a volatilidade e a natureza hidrofóbica, esses estrógenos, uma vez no ambiente aquático, podem permanecer na coluna d'água ou adsorvidos à fase sólida – sedimentos e partículas em suspensão. A fase aquosa e os sedimentos, essenciais para o funcionamento do ecossistema, constituem os principais elementos dos ciclos biogeoquímicos e, além disso, representam uma peça de fundamental importância na cadeia trófica (RIBECCO, 2012).

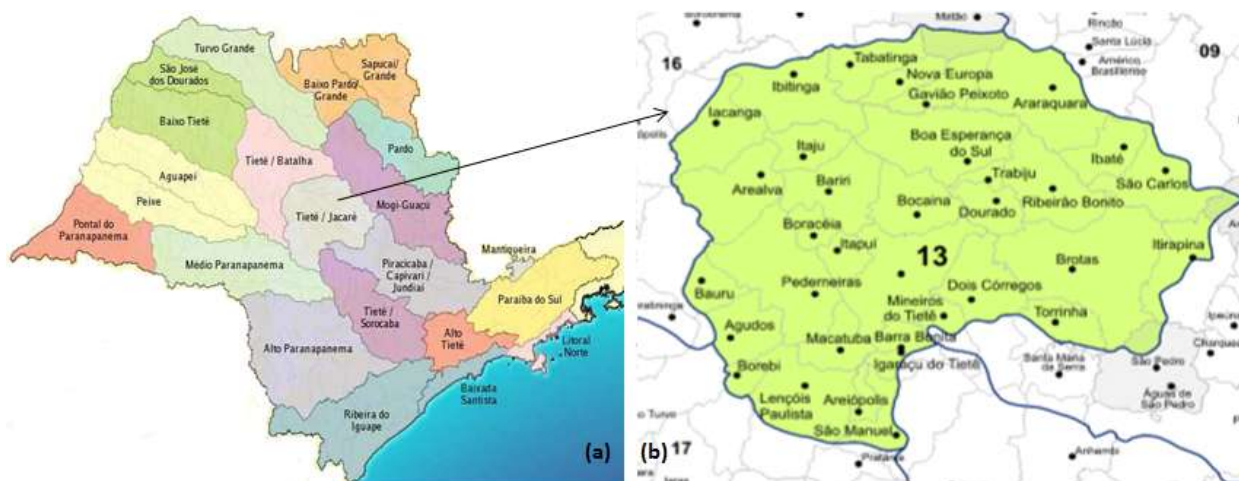
Embora o interesse na fase sólida do compartimento aquático tenha aumentado, somente sedimentos têm sido investigados em detrimento do material particulado em suspensão (MPS), porém é imprescindível incluir todas essas matrizes ambientalmente relevantes na análise química. Além disso, o material particulado em suspensão pode ser fundamental para a compreensão dos mecanismos de distribuição e biodisponibilidade de contaminantes no meio aquático, devido à sua capacidade de transporte ao longo da coluna d'água e para outras regiões (MACHADO, 2011).

Além disso, é necessária a avaliação dos níveis de poluição em todas as amostras do compartimento aquático, considerando a toxicidade associada aos estrógenos, que podem atingir organismos inferiores até aqueles do topo da cadeia trófica, provocando efeitos adversos e representando um risco ao ecossistema.

### **2.2. Caracterização da área de estudo**

A bacia Hidrográfica do Tietê/Jacaré, definida como a Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos 13 (UGRHI-13) pela Lei nº 9.034/94, possui uma área total de aproximadamente 12 mil km<sup>2</sup>. Localiza-se na porção central do Estado de São Paulo, faz limite a norte e oeste com UGRHI-16 (Tietê/Batalha), a leste e sudeste

com a UGRHI-5 (Piracicaba/Capivari/Jundiaí), a sul com as UGRHI-10 e 17 (Tietê/Sorocaba e Médio Paranapanema, respectivamente) e a nordeste com a UGRHI-9 (Mogi-Guaçu) (COMITÊ..., 2013). A Figura III.1 apresenta as 22 UGRHIs do estado de São Paulo, com destaque para UGRHI Tietê-Jacaré e seus municípios.



**Figura III.1.** Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI) do Estado de São Paulo (a) e divisão da UGRHI Tietê/Jacaré (UGRHI-13) (b). Fonte: Comitê da Bacia Hidrográfica Tietê-Jacaré, 2009.

Composta por 34 municípios, esta UGRHI abriga cerca de 7% da população do Estado e, de acordo com dados do Comitê da bacia Hidrográfica Tietê/Jacaré, 94,3% dos habitantes vivem em áreas urbanas.

Nesta UGRHI, são coletados 97,4% do total de efluente doméstico gerado e tratado somente 59,5% com redução percentual da carga orgânica de 50,2%. Muitos municípios mesmo possuindo coleta e tratamento de quase 100% do esgoto gerado, apresentam percentuais de eficiência no tratamento inferiores ao mínimo exigido (80%). A maior parte dessa carga orgânica remanescente provém do município de Bauru (que não possui estação de tratamento) e corresponde a 43,8% do total da UGRHI. O índice de abastecimento público na UGRHI 13 é superior a 99% e, cerca de 70% da água para esse fim é retirada de aquíferos (COMITÊ..., 2009; COMITÊ..., 2013).

Em 2013, a UGRHI chegou a pouco mais de 1,5 milhões de habitantes, sendo a sexta mais habitada do Estado com densidade demográfica média de 94,55 hab/km<sup>2</sup>.

Entre os principais municípios da URGHI-13, em relação ao número de habitantes, encontram-se Bauru e Araraquara com 359.429 e 208.725 habitantes, respectivamente, sendo que Bauru não possui estação de tratamento de esgoto, e Araraquara trata 100% dos 97% do esgoto coletado no município (COMPANHIA..., 2010; IBGE, 2010; COMITÊ..., 2013).

### **2.2.1. Araraquara**

A população total de Araraquara representa 13,43% da população da URGHI-13 (97% no perímetro urbano e 3% na zona rural). A estação de tratamento de esgoto (ETE) trata uma média de 45.000 m<sup>3</sup> de esgoto por dia, e seu efluente é lançado no Ribeirão das Cruzes, enquadrado como rio Classe 4, de acordo com Resolução Conama 357/2005. A água utilizada no abastecimento da cidade é 50% proveniente de pontos de captação superficial (Represa das Cruzes, Ribeirão das Anhumas e Córrego do Paiol) e 50% subterrânea (COMPANHIA..., 2010; IBGE, 2010).

### **2.2.2. Bauru**

Bauru representa 23,87% da população da URGHI-13, sendo que 98,5% da população está no perímetro urbano e 1,5% na zona rural. Neste município, o mais populoso da UGRHI-13, não há tratamento de esgoto, embora a captação atinja 96% dos domicílios. O esgoto sanitário *in natura* é canalizado e lançado em diversos pontos no Rio Bauru e seus 10 afluentes. São lançados aproximadamente 1000 L s<sup>-1</sup> no Rio Bauru, sendo 85% corresponde a despejo residencial e 15% a despejo industrial. O Rio Bauru, conforme Resolução Conama 357/2005, fica classificado como Classe 4 em todo o seu curso na área urbana e Classe 3 da região da Vila Aimorés até Pederneiras onde desemboca no Rio Tietê (COMPANHIA..., 2010; IBGE, 2010).

## **2.3. Clima**

De acordo com a classificação de Köppen, a UGRHI 13 é uma região de clima predominantemente do tipo Cwa - clima quente e úmido, com inverno seco. No mês mais seco apresenta totais de chuvas inferiores a 30 mm; temperaturas médias

superiores a 22°C no mês mais quente, e temperaturas menores que 18°C no mês mais frio. Na UGRHI-13, as temperaturas médias anuais variam de 21 – 23 °C, sendo as médias máximas em Janeiro (29 – 32 °C) e as médias mínimas em Julho (11 – 13 °C). O índice pluviométrico médio anual é de 1.500 – 2.000 mm e o período chuvoso ocorre de Outubro – Março, com o trimestre mais chuvoso de Dezembro – Fevereiro enquanto o período mais seco ocorre de Abril – Setembro, sendo os meses de Junho – Agosto os mais secos (TEODORO, 2008).

#### **2.4. Economia**

Possui uma economia diversificada baseada na agricultura, indústrias em geral e no setor de serviços. As atividades do setor primário da economia desta UGRHI estão concentradas no apoio às cadeias produtivas de produção de açúcar e álcool, suco de laranja, celulose e papel, bebidas e de couro (origem bovina) (BARROS, 2013). Em Araraquara destaca-se o setor sucroalcooleiro com plantio e processamento de citros (com predominância do cultivo da laranja) e a produção e processamento da cana-de-açúcar além de indústrias têxteis e de confecções (MACEDO, 2007). A economia de Bauru está apoiada na forte rede de serviços com destaque para os setores de bebidas e papel entre outros (COMITÊ..., 2013).

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Amostragem

A estratégia de amostragem incluiu duas épocas, uma delas no período chuvoso (Fevereiro) e outra no período seco (Setembro), uma vez que a turbulência ocasionada pelo maior volume de água nos rios poderia influenciar na distribuição dos estrógenos entre a água e a matriz sólida dos mananciais. Os mananciais escolhidos foram o Ribeirão das Cruzes situado no município de Araraquara/SP que recebe os efluentes após o tratamento na ETE da cidade e o Rio Bauru na cidade de Bauru/SP que recebe os efluentes domésticos não tratados uma vez que o município não possui ETE.

Em cada manancial foram escolhidos 15 pontos amostrais situados a montante e a jusante do ponto de lançamento de efluente. A obtenção das amostras foi realizada seguindo os procedimentos de amostragem e preservação da integridade amostral até o momento da manipulação e análise, detalhada na seção 3.4 do Capítulo II. A coleta do sedimento superficial, não pode ser efetuada, pois a amostra não dispunha de características viáveis para aplicação do método. No Ribeirão das Cruzes o sedimento apresentava-se como cascalhos enquanto no Rio Bauru esta matriz era arenosa o suficiente para não adsorver esses compostos hidrofóbicos. A Tabela III.1 apresenta as em que foram realizadas as coletas.

**Tabela III.1.** Data de realização das coletas nos corpos hídricos correspondentes.

Araraquara		Bauru	
Fevereiro	Setembro	Fevereiro	Setembro
05	16	22	02

Em Bauru, esses pontos foram escolhidos com a ajuda do Departamento de Água e Esgoto de Bauru (DAE) através de mapas catalogando os diversos pontos de lançamento de efluente da cidade no rio Bauru. Em Araraquara os pontos de amostragem foram baseados em informações fornecidas pela Prefeitura do Município bem como através de trabalhos desenvolvidos na UNIARA (Centro Universitário de

Araraquara – Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) sobre a gestão de recursos hídricos no município de Araraquara.

As amostras de água também foram submetidas a análises físico-químicas realizadas pela empresa Venturo Análises Ambientais Ltda., cobrindo os parâmetros preconizados na Resolução CONAMA 357/2005 (Dados apresentados no Apêndice C).

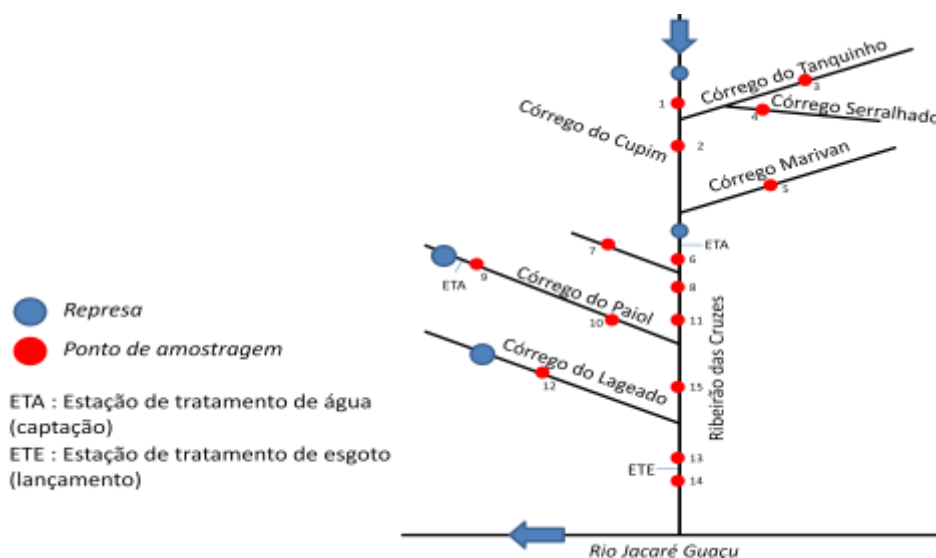
### **3.2. Descrição dos pontos de amostragem**

#### **3.2.1. Ribeirão das Cruzes (Araraquara)**

Tendo em vista que o município trata grande parte do esgoto coletado, foi considerado que embora possa haver lançamento clandestino neste manancial, isso não deve ser de grande importância e a estratégia de amostragem privilegiou pontos a montante e jusante da ETE/Araraquara. A Figura III.2 representa esquematicamente em diagrama unifilar a localização dos pontos amostrais ao longo do Ribeirão das Cruzes. Descrição dos pontos inseridos neste trabalho, suas respectivas coordenadas geográficas e siglas utilizadas ao longo do texto estão na Tabela III.2.

#### **3.2.2. Rio Bauru (Bauru)**

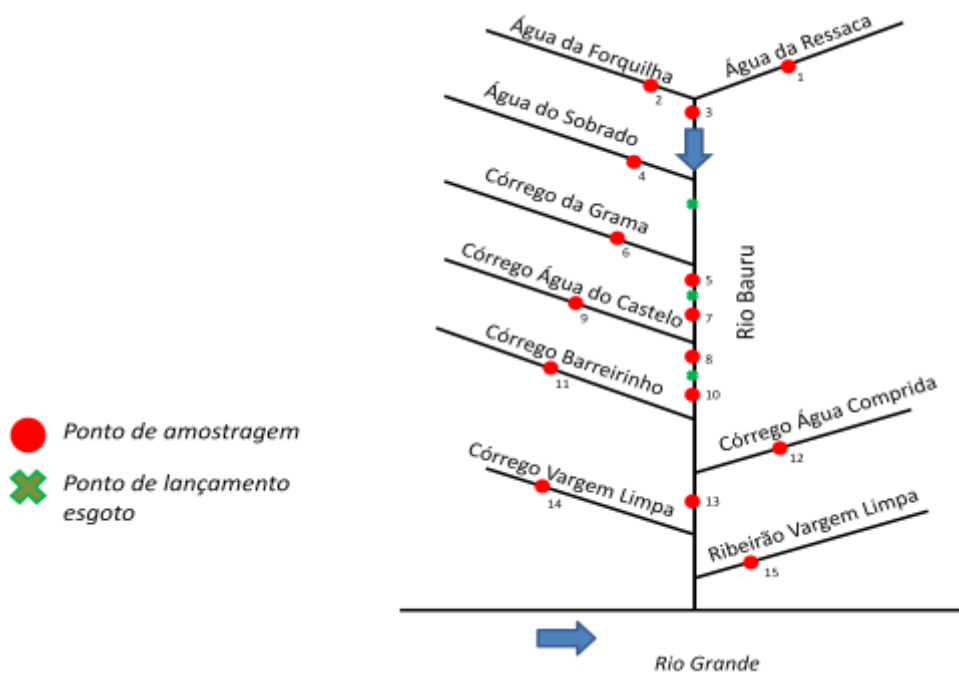
A Figura III.3 representa esquematicamente em diagrama unifilar a localização dos pontos amostrais ao longo do Rio Bauru, com todos os pontos de lançamento de esgoto *in natura* proveniente da rede de captação de esgoto do município. Descrição dos pontos inseridos neste trabalho, suas respectivas coordenadas geográficas e siglas utilizadas ao longo do texto estão na Tabela III.3.



**Figura III.2.** Diagrama unifilar do Ribeirão das Cruzes, com os pontos de amostragem inseridos neste trabalho.

**Tabela III.2.** Descrição e coordenadas geográficas dos pontos amostrais localizados ao longo do Ribeirão das Cruzes, Araraquara/SP.

Pontos amostrais	Descrição	Coordenadas geográficas
Ponto 1 AQA (Ribeirão das Cruzes - represa)	Mais próximo à nascente. Situa-se a jusante de um pesque-pague.	21° 44,398'S 40° 10,158'O
Ponto 2 AQA (Ribeirão das Cruzes)	Situado a 200m do pto 1. Presença de erosão e mata ciliar densa.	21° 44,463'S 48° 10,155'O
Ponto 3 AQA (Córrego do Tanquinho)	Localizado no perímetro urbano e sofre influência antrópica.	21° 44198'S 48° 09,165'O
Ponto 4 AQA (Córrego do Serralhado)	Localizado no perímetro urbano. Córrego canalizado com pouca mata ciliar.	21° 44499'S 48° 09,394'O
Ponto 5 AQA (Córrego Marivan)	Localizado no perímetro urbano. Trechos canalizados e alta densidade mata ciliar.	21° 45317'S 48° 10,171'O
Ponto 6 AQA (Ribeirão das Cruzes)	Trecho urbano. Situa-se a jusante da represa de captação da ETA.	21° 45,408'S 48° 10,544'O
Ponto 7 AQA (Córrego do Cupim)	Localizado no perímetro urbano. Córrego com grande quantidade de areia e com lançamento de efluente.	21° 45155'S 48° 11,297'O
Ponto 8 AQA (Ribeirão das Cruzes)	Localizado próximo ao antigo Matadouro Municipal.	21° 46,133'S 48° 11,295'O
Ponto 9 AQA (Córrego do Paiol)	Localizado no perímetro urbano próximo a captação da ETA. Sofre influência antrópica.	21° 45,448'S 48° 12,342'O
Ponto 10 AQA (Córrego do Paiol)	Localizado as margens da rodovia com alta densidade de mata ciliar.	21° 47,364'S 48° 12,429'O
Ponto 11 AQA (Ribeirão das Cruzes)	Localizado as margens da rodovia.	21° 47,545'S 48° 12,203'O
Ponto 12 AQA (Córrego Lageado)	Localizado as margens de rodovia cercado por plantação de cana-de-açúcar.	21° 47,081'S 48° 14,122'O
Ponto 13 AQA (Ribeirão das Cruzes)	Montante do lançamento de efluente tratado.	21° 49,219'S 48° 15,097'O
Ponto 14 AQA (Ribeirão das Cruzes)	Jusante do lançamento de efluente tratado.	21° 49,228'S 48° 15,123'O
Ponto 15 AQA (Ribeirão das Cruzes)	Fazenda Salto Grande.	22° 18,836'S 49° 02,027'O



**Figura III.3.** Diagrama unifilar do Rio Bauru com os pontos de amostragem inseridos neste trabalho.

**Tabela III.3.** Descrição e coordenadas geográficas dos pontos amostrais localizados ao longo do Rio Bauru, Bauru/SP.

Pontos amostrais	Descrição	Coordenadas geográficas
Ponto 1 BAU (Água da Ressaca)	Córrego mais afastado do perímetro urbano. Próximo a chácaras e condomínios.	22° 37,418'S 49° 06,943'O
Ponto 2 BAU (Água da Forquilha)	Córrego próximo a junção com a Ressaca. Presença de residência na margem esquerda.	22° 34,448'S 49° 08,015'O
Ponto 3 BAU (Ressaca + Forquilha)	Início do Rio Bauru.	22° 20,523'S 49° 04,770'O
Ponto 4 BAU (Água do Sobrado)	Córrego localizado no perímetro urbano.	22° 19,860'S 49° 05,117'O
Ponto 5 BAU (Rio Bauru)	Localizado no perímetro urbano sob elevada influência de esgoto doméstico.	22° 19,758'S 49° 04,979'O
Ponto 6 BAU (Córrego da Grama)	Situado dentro do perímetro urbano.	22° 32,105'S 49° 08,949'O
Ponto 7 BAU (Rio Bauru)	Localizado no perímetro urbano sob elevada influência de esgoto doméstico.	22° 19,213'S 49° 04,544'O
Ponto 8 BAU (Rio Bauru)	Localizado no perímetro urbano sob elevada influência de esgoto doméstico.	22° 18,735'S 49° 04,240'O
Ponto 9 BAU (Água do Castelo)	Córrego situado no perímetro urbano.	22° 18,366'S 49° 04,745'O
Ponto 10 BAU (Rio Bauru)	Localizado no perímetro urbano sob elevada influência de esgoto doméstico.	22° 18,662'S 49° 03,772'O
Ponto 11 BAU (Barreirinho)	Córrego na área urbana.	22° 18,287'S 49° 02,932'O
Ponto 12 BAU (Água Comprida)	Córrego na área urbana.	22° 18,852'S 49° 02,179'O
Ponto 13 BAU (Rio Bauru)	Situado no perímetro urbano a jusante do último ponto de lançamento de esgoto.	22° 18,252'S 49° 02,025'O
Ponto 14 BAU (Cor. Vargem Limpa)	Situado fora do perímetro urbano.	22° 17,204'S 49° 02,351'O
Ponto 15 BAU (Rib. Vargem Limpa)	Situado fora do perímetro urbano.	22° 18,836'S 49° 02,027'O

### 3.3. Análise Estatística dos dados

Devido à existência de diferentes fatores que podem influenciar a dispersão dos contaminantes no ambiente aquático e, embora sejam mananciais com características morfológicas e hidrodinâmicas distintas, foram aplicadas nas amostras de água e material particulado, análises multivariadas (indicadas para dados não paramétricos) utilizando análise de componentes principais (PCA) e agrupamento hierárquico (HCA), no intuito de verificar a distribuição dos estrógenos nos mananciais hídricos inseridos neste estudo em épocas sazonais diferentes.

A PCA foi utilizada para reduzir a dimensionalidade dos dados, procurando descrevê-los através de um conjunto de transformações que não alteram a informação, mas a simplifica quando torna possível a expressão/visualização gráfica das amostras (*scores*) e as variáveis em estudo (*loadings*).

A HCA baseia-se na partição de uma população heterogênea em vários grupos e subgrupos homogêneos. No agrupamento não há classes pré-definidas, os elementos são agrupados de acordo com a semelhança.

Neste trabalho, os dados para os resultados em água e material particulado estão organizados na seguinte sequência: Análise de Componentes Principais (PCA) seguida pela Análise Hierárquica de Agrupamento (HCA). Finalmente, estabeleceu-se uma correlação em função dos locais de amostragem na mesma cidade (Araraquara ou Bauru) e nos referidos períodos de tempo (Fevereiro e Setembro). Todas as operações matemáticas e estatísticas foram realizadas com auxílio do programa Statistica 15.0.

#### 4. Resultados e Discussão

Para quantificação dos analitos, foram construídas curvas nos detectores FLD e UV, pois se esperava concentrações elevadas de coextrativos que poderiam atrapalhar a quantificação por fluorescência.

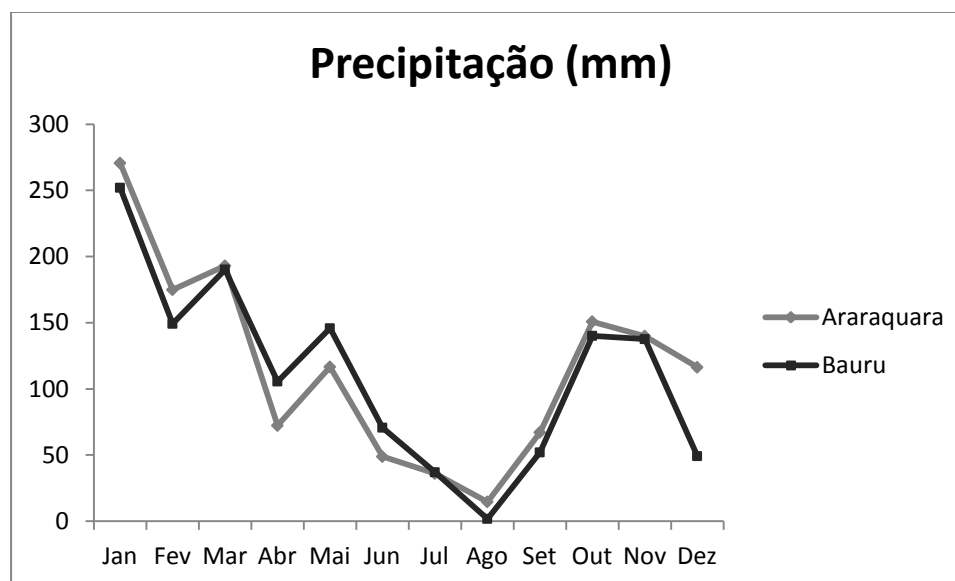
Os analitos presentes nas amostras de água superficial e material particulado em suspensão coletadas no Ribeirão das Cruzes e Rio Bauru foram quantificados por HPLC-FLD, uma vez que suas concentrações só apresentam o sinal analítico neste detector. Somente o estriol presente nas amostras de água superficial coletadas no Rio Bauru foram quantificados utilizando a curva preparada na matriz com detecção por ultravioleta. Esse comportamento já havia sido previsto uma vez que este manancial recebe o efluente doméstico *in natura* de toda a cidade o que resulta em concentrações elevadas de compostos endógenos. A Tabela III.4 sumariza o modo de detecção utilizado na quantificação dos estrógenos inseridos neste estudo.

**Tabela III.4.** Modo de detecção e quantificação dos analitos presentes nas amostras de água e material particulado coletadas nos mananciais.

Estrógenos	Água Superficial			
	Araraquara		Bauru	
	Fev	Set	Fev	Set
E1	FLD	FLD	FLD	FLD
E2	FLD	FLD	FLD	FLD
E3	FLD	FLD*	UV	UV***
EE2	FLD	FLD	FLD**	FLD
	Material Particulado em Suspensão			
	Araraquara		Bauru	
	Fev	Set	Fev	Set
E1	FLD	FLD	FLD	FLD
E2	FLD	FLD	FLD	FLD
E3	FLD	FLD	FLD	FLD
EE2	FLD	FLD	FLD	FLD

\* Pto 14 quantificado pelo UV; \*\*Pto 14 e 15 quantificado pelo UV; \*\*\*Pto 1, 2, 3, 4, 6 e 9 quantificados pelo FLD.

Com uma pequena massa de amostra (0,4 – 43,0 mg) retida na membrana de fibra de vidro e concentração proporcionalmente menor, quando comparada à matriz água, foi realizada a quantificação dos estrógenos em material particulado em suspensão na coluna d'água somente utilizando a detecção por fluorescência. A densidade do MPS foi superior no mês de Fevereiro onde o índice pluviométrico foi maior e, conseqüentemente, a turbulência da água foi mais elevada, o que favorece a ressuspensão de sedimentos superficiais para coluna d'água. A Figura III.4 apresenta os dados pluviométricos para os municípios de Araraquara e Bauru. Os dados de temperatura (máxima e mínima) e dias com chuva observados estão dispostos no Apêndice G.



**Figura III.4.** Dados pluviométricos observados pela Defesa Civil do Estado de São Paulo, para os municípios de Araraquara e Bauru, no ano de 2013.

As Tabelas III.5 e III.6 compilam os dados obtidos para todas as amostras inseridas neste estudo. Alguns desses dados são apresentados nas próximas seções como gráficos, para melhor interpretação visual e discussão dos resultados.

**Tabela III.5.** Concentração dos estrógenos naturais e sintético obtidos da análise em água e material particulado em suspensão (n = 9) do **Ribeirão das Cruzes** (Araraquara/SP).

	Água superficial (ng mL <sup>-1</sup> )								MPS (ng g <sup>-1</sup> )							
	Fev 2013				Set 2013				Fev 2013				Set 2013			
	E1	E2	E3	EE2	E1	E2	E3	EE2	E1	E2	E3	EE2	E1	E2	E3	EE2
<b>PTO 1</b>	< 1,2	< 0,02	<b>0,07</b>	< 0,06	< 1,2	< 0,02	<0,009	< 0,06	< 290	< 410	< 460	< 430	< 290	< 410	< 700	< 430
<b>PTO 2</b>	< 1,2	< 0,02	<b>0,16</b>	< 0,06	< 1,2	< 0,02	<0,009	< 0,06	< 290	< 410	< 460	< 430	< 290	< 410	< 460	< 430
<b>PTO 3</b>	< 1,2	<b>0,04</b>	<b>0,17</b>	< 0,06	< 1,2	< 0,02	<0,009	< 0,06	< 290	<b>758,4</b>	< 700	< 430	< 290	< 410	< 460	< 430
<b>PTO 4</b>	< 1,2	<b>0,04</b>	<b>0,20</b>	< 0,06	< 1,2	< 0,02	<0,009	< 0,06	< 290	< 410	< 700	< 430	< 290	< 600	< 460	< 430
<b>PTO 5</b>	< 1,2	<b>0,08</b>	<b>0,10</b>	< 0,06	< 1,7	< 0,02	<0,009	< 0,06	< 290	< 410	<b>1118,5</b>	< 430	< 290	< 410	< 460	< 430
<b>PTO 6</b>	< 1,2	<b>0,03</b>	<b>0,19</b>	< 0,06	< 1,2	< 0,02	<0,009	< 0,06	< 290	< 410	< 460	< 430	< 290	< 410	< 460	< 430
<b>PTO 7</b>	< 1,2	<b>0,04</b>	<b>0,02</b>	< 0,06	< 1,7	< 0,02	<0,009	< 0,06	< 290	< 410	< 460	< 430	< 290	< 410	< 700	< 430
<b>PTO 8</b>	< 1,2	< 0,02	<b>0,14</b>	< 0,06	< 1,2	< 0,02	<0,009	< 0,06	< 290	< 410	< 460	< 430	< 290	< 410	< 460	< 430
<b>PTO 9</b>	< 1,2	<b>0,06</b>	<b>0,31</b>	< 0,06	< 1,2	< 0,02	<0,009	< 0,06	< 290	< 410	< 460	< 430	< 290	< 410	< 460	< 430
<b>PTO 10</b>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	<b>1,8</b>	<b>2,6</b>	<b>0,2</b>	< 0,06	< 290	< 410	< 460	< 430	< 290	< 410	< 460	< 430
<b>PTO 11</b>	< 1,2	< 0,02	<b>0,15</b>	< 0,06	<b>2,3</b>	< 0,02	<0,009	< 0,06	< 290	< 410	< 460	< 430	< 290	< 410	< 460	< 430
<b>PTO 12</b>	< 1,2	< 0,03	<b>0,15</b>	< 0,06	< 1,2	< 0,02	<0,009	< 0,06	< 290	< 410	< 460	< 430	< 290	< 410	< 460	< 430
<b>PTO 13</b>	< 1,2	< 0,02	<b>0,21</b>	< 0,06	< 1,7	< 0,02	<0,009	< 0,06	< 290	< 410	< 460	< 430	< 290	< 410	< 460	< 430
<b>PTO 14</b>	< 1,2	< 0,02	<0,009	< 0,06	<b>4,1</b>	< 0,02	<0,009	<b>0,2</b>	< 290	< 410	< 460	< 430	< 290	< 410	< 460	< 430
<b>PTO 15</b>	< 1,2	< 0,03	<b>0,06</b>	< 0,06	< 1,2	< 0,02	<0,01	< 0,06	< 290	< 410	< 460	< 430	< 290	< 410	< 460	< 430

\* n.a. (não analisado). Os valores de LD e LQ para água e material particulado estão dispostos nas seções 4.3.1 e 4.3.3 do Capítulo II, respectivamente.

**Tabela III.6.** Concentração dos estrógenos naturais e sintético obtidos na análise em água e material particulado em suspensão (n = 9) do **Rio Bauru** (Bauru/SP).

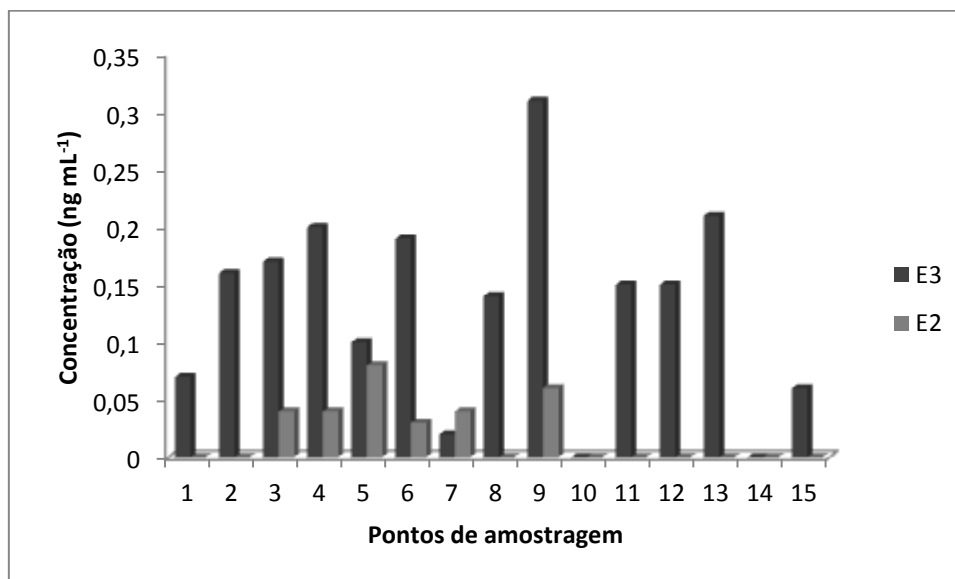
	Água superficial (ng mL <sup>-1</sup> )								MPS (ng g <sup>-1</sup> )							
	Fev 2013				Set 2013				Fev 2013				Set 2013			
	E1	E2	E3	EE2	E1	E2	E3	EE2	E1	E2	E3	EE2	E1	E2	E3	EE2
<b>PTO 1</b>	< 1,2	< 0,02	<0,009	< 0,06	< 1,2	< 0,02	<b>0,02</b>	< 0,06	< 290	< 410	< 460	< 430	< 290	< 600	< 460	< 430
<b>PTO 2</b>	< 1,2	< 0,02	<0,009	< 0,06	< 1,2	< 0,02	<b>0,3</b>	< 0,06	< 290	< 410	< 460	< 430	< 290	< 410	< 460	< 430
<b>PTO 3</b>	< 1,2	< 0,02	<0,009	< 0,06	< 1,2	< 0,02	<b>0,3</b>	< 0,06	< 290	< 410	< 460	< 430	< 290	< 410	< 460	< 430
<b>PTO 4</b>	< 1,2	< 0,02	<b>0,16</b>	< 0,06	< 1,2	< 0,02	<b>0,2</b>	< 0,06	< 290	< 410	< 460	< 430	< 290	< 410	< 460	< 430
<b>PTO 5</b>	<b>10,4</b>	<b>0,4</b>	<b>0,03</b>	<b>0,6</b>	<b>3,2</b>	< 0,03	<0,009	<b>0,16</b>	< 290	< 410	<b>14403,8</b>	< 630	< 290	< 410	< 460	<b>4855,9</b>
<b>PTO 6</b>	< 1,2	< 0,02	<b>0,03</b>	< 0,06	< 1,2	< 0,02	<b>0,3</b>	< 0,06	< 290	< 410	<b>800,1</b>	< 430	< 290	< 410	< 460	<b>791,8</b>
<b>PTO 7</b>	<b>6,9</b>	<b>0,2</b>	<b>0,05</b>	<b>0,3</b>	<b>2,3</b>	<b>0,07</b>	<b>0,2</b>	<b>0,21</b>	< 290	< 410	<b>1074,0</b>	<b>1594,0</b>	< 290	< 410	<b>10371,3</b>	<b>3193,1</b>
<b>PTO 8</b>	<b>5,8</b>	<b>0,2</b>	<b>0,03</b>	<b>0,2</b>	<b>2,6</b>	<b>0,05</b>	<b>0,2</b>	<b>0,29</b>	< 290	< 410	< 460	< 430	< 290	< 410	< 460	<b>1646,0</b>
<b>PTO 9</b>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	< 1,2	< 0,02	<b>0,9</b>	< 0,06	< 290	< 410	< 460	< 430	< 290	<b>971,9</b>	< 460	< 430
<b>PTO 10</b>	< 1,2	< 0,02	<0,009	< 0,06	<b>2,2</b>	<b>0,04</b>	<b>0,06</b>	<b>0,20</b>	< 290	< 410	< 700	< 430	< 290	< 410	< 460	< 630
<b>PTO 11</b>	<b>17,0</b>	<b>0,5</b>	< 0,01	<b>0,2</b>	< 1,2	<b>0,03</b>	<0,009	< 0,06	< 290	< 410	<b>3826,2</b>	< 430	< 290	< 410	< 460	<b>1217,0</b>
<b>PTO 12</b>	< 1,2	< 0,02	< 0,01	< 0,06	< 1,2	< 0,03	<b>0,02</b>	<b>0,17</b>	< 290	< 410	< 460	< 430	< 290	< 410	<b>5523,0</b>	<b>8946,8</b>
<b>PTO 13</b>	<b>4,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	< 1,2	<b>0,03</b>	<b>0,02</b>	<b>0,23</b>	< 290	< 410	<b>2539,3</b>	<b>1044,0</b>	< 290	< 410	< 460	< 430
<b>PTO 14</b>	< 1,2	< 0,02	<0,009	< 0,06	< 1,2	< 0,02	<0,009	< 0,06	< 290	< 410	< 460	< 430	< 290	< 410	< 460	< 430
<b>PTO 15</b>	< 1,2	< 0,02	<0,009	< 0,06	< 1,2	< 0,02	<b>0,02</b>	< 0,06	< 290	< 410	< 460	< 430	< 290	< 410	< 460	< 430

\* n.a. (não analisado). Os valores de LD e LQ para água e material particulado estão dispostos nas seções 4.3.1 e 4.3.3 do Capítulo II, respectivamente.

#### 4.1. Ribeirão das Cruzes (Araraquara/SP)

A distribuição dos microcontaminantes neste corpo hídrico, refletida nas concentrações dos estrógenos nas amostras de água e MPS, indica a tendência desses compostos permanecerem dissolvidos na coluna d'água embora suas propriedades físico-químicas (baixa solubilidade em água, natureza hidrofóbica e altos valores de  $K_{ow}$  e  $K_{oc}$ ), a princípio, sugerissem tendência à adsorção em sedimentos superficiais e MPS. Esse comportamento observado no Ribeirão das Cruzes pode estar relacionado às características do sedimento deste manancial, que apresenta baixos teores de argila (13,7%) e matéria orgânica (12,9%), uma vez que contaminantes hidrofóbicos tendem a adsorver preferencialmente a partículas finas (argila) com alto teor de matéria orgânica. É importante lembrar que a partição água/MPS não depende exclusivamente da natureza hidrofóbica dos compostos, mas também de fatores como matéria orgânica, condições hidrodinâmicas e processos biológicos que ocorrem no ambiente aquático (ARDITSOGLU e VOUTSA, 2012).

Em meses mais chuvosos e de temperaturas elevadas, como Fevereiro, o volume de água aumenta e ressuspende para coluna d'água, com maior facilidade sedimentos superficiais, que podem conter estrógenos adsorvidos. Esse movimento de ressuspensão-sedimentação libera os estrógenos fracamente adsorvidos à superfície negativa das substâncias húmicas e aumenta sua concentração na água, como observado nesse estudo. Dos estrógenos inseridos neste trabalho, observou-se principalmente a presença dos naturais 17  $\beta$ -Estradiol (E2) e seu produto de degradação, estriol (E3) em maior concentração nas amostras de água. A Figura III.5 representa esquematicamente a distribuição do E2 e E3 ao longo do Ribeirão das Cruzes e seus afluentes.



**Figura III.5.** Distribuição da concentração dos estrógenos naturais E2 e E3 obtidas nas amostras de água coletadas em Fevereiro no Ribeirão das Cruzes e afluentes.

Por outro lado, no material particulado em suspensão, apenas E2 e E3 foram detectados no primeiro mês da coleta sazonal, no qual a concentração de MPS é alta, resultante de índices pluviométricos maiores. Em Setembro, nenhum dos estrógenos foi detectado e/ou quantificado, o que pode ser explicado pela menor densidade de MPS observada para este mês em decorrência de chuvas menos intensas.

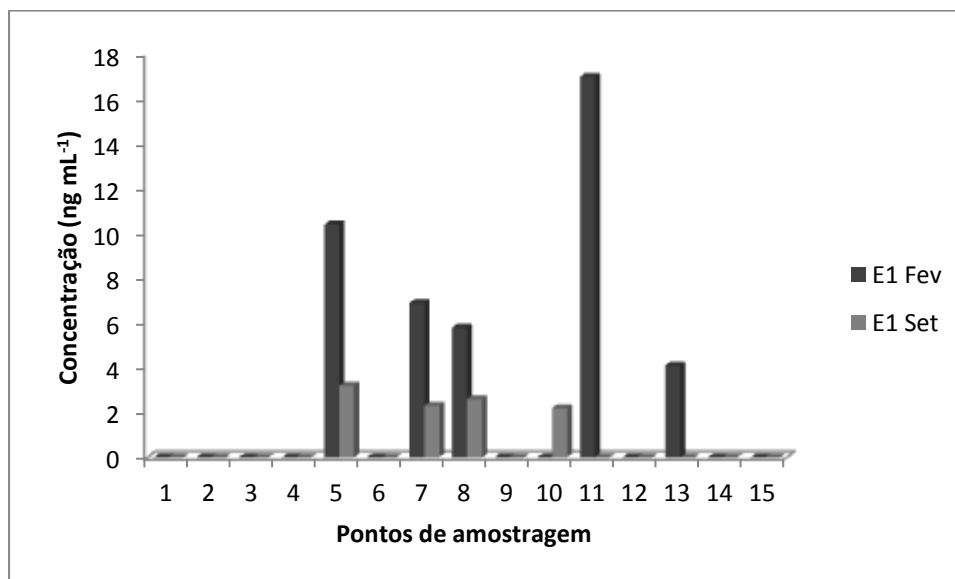
#### 4.2. Rio Bauru (Bauru/SP)

Nas matrizes de interesse ambiental avaliadas no Rio Bauru foram encontradas concentrações dos quatro estrógenos inseridos neste trabalho, distribuídos na coluna d'água e MPS. Detectou-se a presença desses compostos durante as duas campanhas de amostragem, principalmente na fase dissolvida, em um grande número de pontos amostrais ao longo do rio, o que já se inferia, visto que este corpo hídrico recebe diariamente cargas elevadas de esgoto não tratado, principal meio de contaminação por estrógenos. De acordo com o último relatório da Cetesb (COMITÊ..., 2013), este município é o maior gerador de esgoto doméstico e, conseqüentemente, da carga orgânica poluidora de toda a UGRHI – 13, à qual está inserido.

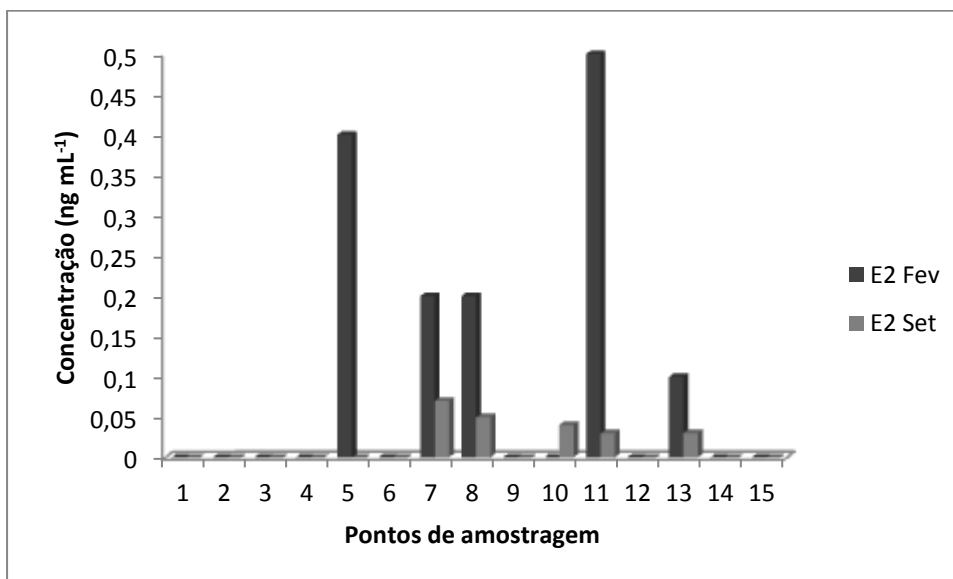
Os valores de concentração dos estrógenos naturais encontrados no Rio Bauru e seus afluentes, principalmente nos locais próximos a lançamento do efluente, indicam

que apesar do aporte contínuo desses microcontaminantes no ambiente aquático seu tempo de meia vida é relativamente curto e a taxa de degradação é alta sinalizando o aparecimento de E1 e E3 em concentrações maiores comparadas ao E2. Nos meses referentes à coleta, os estrógenos naturais foram quantificados principalmente nos pontos amostrais localizados no Rio Bauru.

Como pode ser observado nas Figuras III.6 e III.7, para os estrógenos E1 e E2 as concentrações são maiores quando o índice pluviométrico foi mais elevado, principalmente a partir do ponto de amostragem número 5, que corresponde ao primeiro local do Rio Bauru que já sofre influência do esgoto *in natura*. Os locais de amostragem P1 – P4, onde não foram observadas concentrações desses analitos, correspondem a afluentes do rio Bauru que não mais recebem descarga de efluente, pois o esgoto que ali era lançado foi canalizado até o Rio Bauru em virtude das obras de construção da estação de tratamento de esgoto do município.

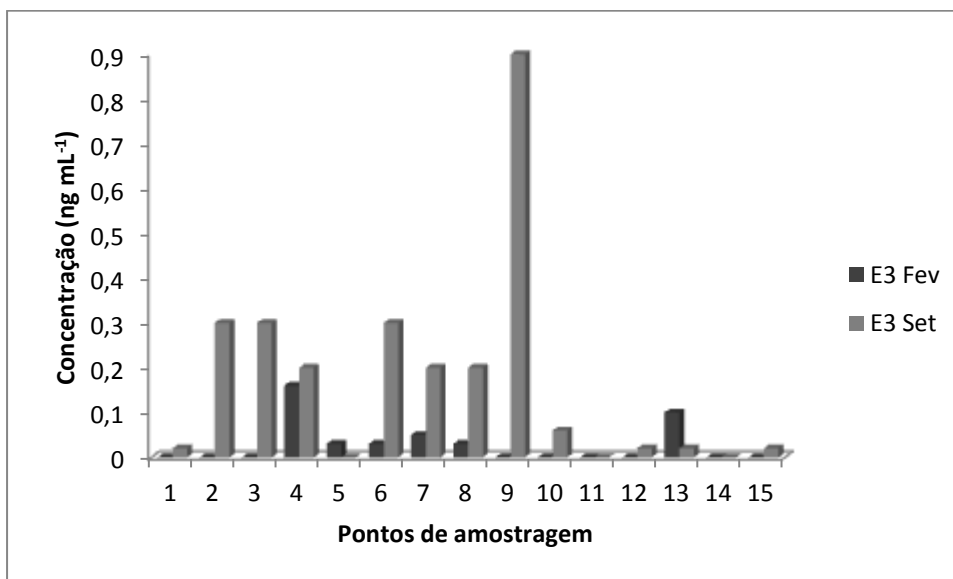


**Figura III.6.** Distribuição das concentrações do estrógeno natural E1 obtidas nas amostras de água coletadas em Fevereiro e Setembro no Rio Bauru e afluentes.



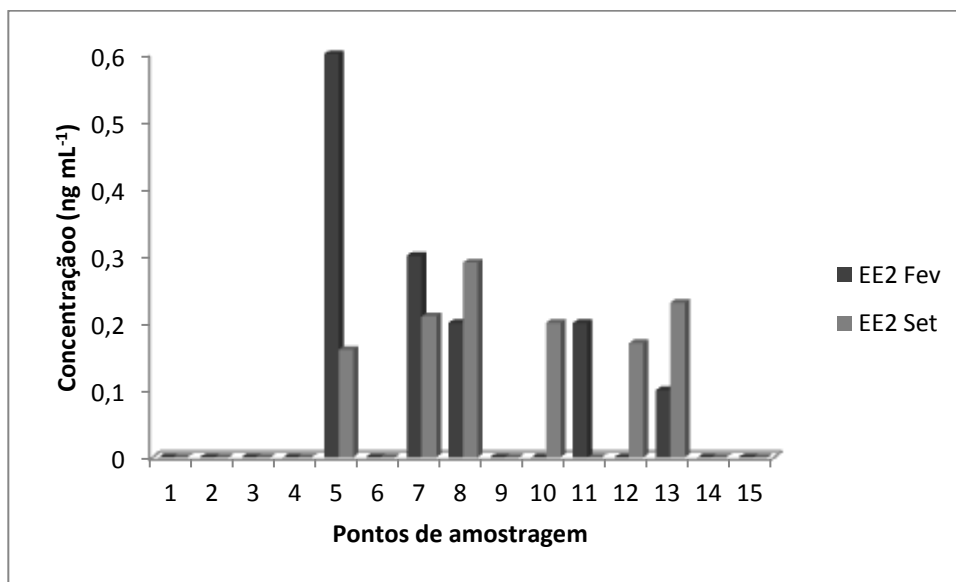
**Figura III.7.** Distribuição das concentrações do estrógeno natural E2 obtidas nas amostras de água coletadas em Fevereiro e Setembro no Rio Bauru e afluentes.

Ao contrário dos estrógenos E1 e E2, o estriol (E3) foi encontrado em maiores concentrações em Setembro (Figura III.8), que corresponde ao mês de índice pluviométrico baixo. Isso pode estar atrelado a uma combinação de fatores naturais além da pluviosidade e temperatura, o que torna difícil a atribuição exata dos principais agentes causadores deste comportamento. Além disso, dos estrógenos em análise somente o E3 foi observado nos pontos que não mais recebem descarga do efluente (P2 – P4), o que corrobora com o fato deste composto ser o produto final da degradação do estrógeno natural E2.



**Figura III.8.** Distribuição das concentrações do estrógeno natural E3 obtidas nas amostras de água coletadas em Fevereiro e Setembro no Rio Bauru e afluentes.

O estrogênio sintético, EE2 presente em pílulas contraceptivas também foi detectado em 100% das amostras de água coletadas no trecho do Rio Bauru inserido no perímetro urbano (P5, P7, P8, P10 e P13), durante os meses de coleta (Figura III.9). As concentrações obtidas são maiores quando comparada ao E3, produto de degradação do estrógeno natural E2. Esse comportamento pode estar ligado à população feminina flutuante e em idade fértil da cidade bem como ao fato desse composto ser mais estável em água comparado aos estrógenos naturais. Assim como para E1 e E2, não foram detectados os analitos de interesse nos pontos amostrais P1 – P4.



**Figura III.9.** Distribuição das concentrações do estrógeno sintético EE2 obtidas nas amostras de água coletadas em Fevereiro e Setembro no Rio Bauru e afluentes.

No tocante ao MPS do Rio Bauru, mesmo não possuindo informações de granulometria e matéria orgânica do sedimento, é sabido que o mesmo tem características arenosas e, portanto não adsorve fortemente esses analitos hidrofóbicos. Isso ocorre porque a areia, sendo constituída por grãos de quartzo, tem menor capacidade de acumulação de compostos orgânicos (SEWALD et al., 2012). Dessa forma, infere-se que o MPS obtido do Rio Bauru se constitui quase que em sua totalidade por partículas sólidas do efluente doméstico com elevado teor de matéria orgânica, lançado diretamente nesse manancial, o que explica as elevadas concentrações encontradas para EE2 (791,8 – 8946,8 ng g<sup>-1</sup>) e E3 (800,1 – 14403,8 ng g<sup>-1</sup>) nos meses de Fevereiro e Setembro em especial nos pontos de coleta do Rio Bauru.

#### 4.3. Comparação entre os mananciais

No Rio Bauru, que recebe efluente *in natura* da cidade, a detecção e concentração de estrógenos em água foi mais expressiva em relação ao Ribeirão das Cruzes, que atua como corpo receptor dos efluentes tratados da cidade de Araraquara/SP. Isso reflete a necessidade da implantação de plantas de tratamento que podem contribuir significativamente para remoção de contaminantes orgânicos nos

**Tabela III.7.** Comparação das concentrações de estrógenos em matrizes aquosas e sólidas obtidas em outros países com os deste estudo.

País	Ano	Matriz	Concentrações ng L <sup>-1</sup> ou ng g <sup>-1</sup>				Referência
			E1	E2	E3	EE2	
Espanha	2012	Água de rio	0,12 – 17,0	n.d.	n.d.	n.d.	Esteban et al. (2014)
China	2010	Água de rio	0,45 – 2,98	0,26 – 1,78	2,14 – 4,37	0,28 – 2,67	Jiang et al. (2012)
Shangai	n.i.	Água potável	≤ 5,0	≤ 28	≤ 4	≤ 20	Nie et al. (2013)
Portugal	n.i.	Água de rio	n.a.	12,05	n.a.	11,2	Lima et al. (2013)
Beijng	2011/2012	Água de rio	0,18 – 10,9	0,04 – 1,58	0,002 – 0,12	0,07 – 0,6	Li et al. (2013)
Espanha	n.i.	Sedimento	n.d.	0,09	n.a.	210	Azzouz e Ballesteros (2012)
		Lodo	n.d.	n.d.	n.d.	450	
Espanha	n.i.	Sedimento	n.d.	n.d.	n.d.	48,1	Martin et al. (2010)
China	2010	Água de rio	0,002 – 1,2	0,02 – 0,03	2,3 – 26,1	2,7 – 47,1	Huang et al. (2013)
Brasil	2010	Sedimento de mangue	0,02 – 49,27	0,03 – 39,77	n.a.	0,1 – 120	Froehner et al. (2012)
Brasil	2006	Água superficial	0,6	0,026	n.a.	n.a.	Lopez et al. (2010)
Brasil		Água potável	n.d.	n.d.	0,001 – 0,007	n.d.	Jardim et al. (2012)
Brasil	2013	Água de rio	0,002 – 0,017	≤ 0,0026	≤ 0,0001	≤ 0,0002	Este estudo
		MPS	n.d.	≤ 971,9	≤ 14403	≤ 4855	

n.i. – não informado; n.a. – não analisado; n. d. – não detectado.

corpos hídricos, que muitas vezes são utilizados para abastecimento público. Além disso, a presença de contaminantes nos corpos hídricos pode afetar de organismos bentônicos até os peixes. Estes compostos são responsáveis por alterações na vida aquática e nos humanos dentre as quais já comprovadas: aparecimento de câncer, redução da fertilidade, alterações nos sistemas nervoso e endócrino, reversão sexual peixes, entre outros. A Tabela III.7 apresenta concentrações dos estrógenos encontradas em água, sedimento e lodo de esgoto em diferentes países em relação ao encontrado neste trabalho. Neste trabalho as concentrações obtidas para amostras de água foram menores em relação aos trabalhos descritos na literatura, nos quais também não foram realizadas análise do material particulado em suspensão.

Para uma visão geral e maior compreensão dos dados obtidos, métodos multivariados de análises foram aplicados a todas as amostras, tais como: PCA (Análise de Componentes Principais) e HCA (Análise Hierárquica por Cluster).

#### **4.4. Análise estatística dos resultados**

Para interpretação dos dados através da PCA e HCA, os dados foram arranjados considerando locais de amostragem e períodos de tempo em relação às variáveis analisadas (estrógenos), resultado em uma matriz com dimensões 62 x 4 (Tabela III.8), para água superficial e material particulado, separadamente. Os dados, por apresentarem grandezas diferentes foram submetidos a um processo de autoescalamento.

**Tabela III.8.** Matriz gerada pela análise de componentes principais e codificação dos locais de amostragem utilizados no tratamento estatístico.

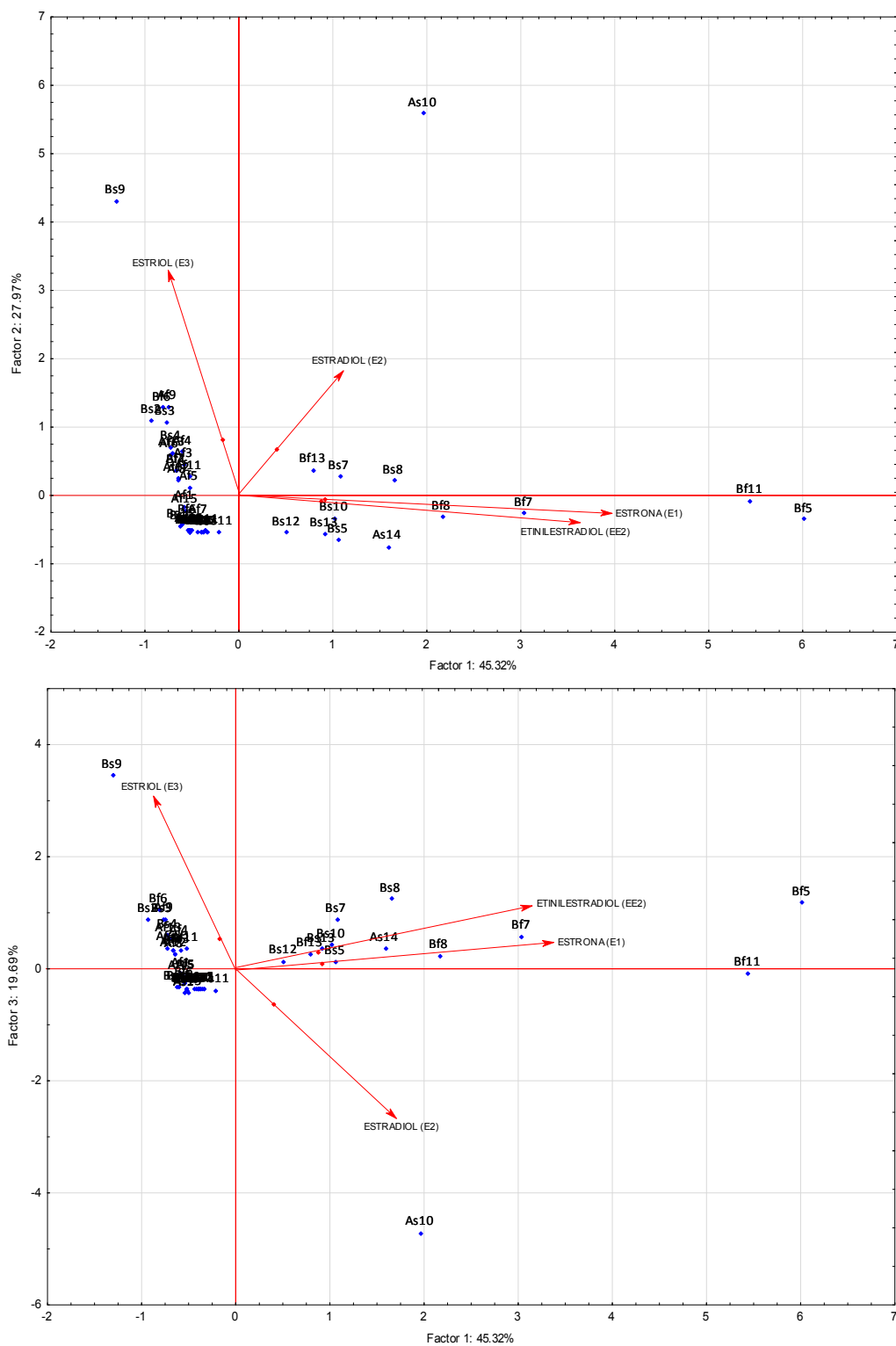
Cidade	Local de amostragem	Período					
		Fevereiro	Setembro				
Araraquara	P1 - Represa	Af1	As1	Bauru	P1 - Ressaca	Bf1	Bs 1
	P2 - Represa	Af2	As2		P2 - Forquilha	Bf2	Bs 2
	P3 - Tanquinho	Af3	As3		P3 - Ressaca + Forquilha	Bf3	Bs 3
	P4 - Serralhado	Af4	As4		P4 - Sobrado	Bf4	Bs 4
	P5 - Marivan	Af5	As5		P5 - Rio Bauru	Bf5	Bs 5
	P6 - Rib Cruzes	Af6	As6		P6 - Grama	Bf6	Bs 6
	P7 - Cupim	Af7	As7		P7 - Rio Bauru	Bf7	Bs 7
	P8 - Matadouro	Af8	As8		P8 - Rio Bauru	Bf8	Bs 8
	P9 - Paiol	Af9	As9		P9 - Castelo	Bf9	Bs 9
	P10 - Rib Cruzes	Af10	As10		P10 - Rio Bauru	Bf10	Bs 10
	P11 - Rib Cruzes	Af11	As11		P11 - Barreirinho	Bf11	Bs 11
	P12 - Lageado	Af12	As12		P12 - Água Comprida	Bf12	Bs 12
	P13 - ETE montante	Af13	As13		P13 - Rio Bauru	Bf13	Bs 13
	P14 - ETE jusante	Af14	As14		P14 - Cór. Vargem Limpa	Bf14	Bs 14
	P15 - Salto Grande	Af15	As15		P15 - Rib. Vargem Limpa	Bf15	Bs 15
				P16 - Madureira	Bf16	Bs 16	

#### 4.4.1. Água Superficial

##### 4.4.1.1. Análise dos Componentes Principais

As componentes principais geradas (CP1, CP2 e CP3) para as amostras de água explicaram 45,32%, 27,97% e 19,69%, respectivamente, totalizando 92,98%. Para um sistema de correlação, como a PCA, considera-se que valores acima de 0,7 já são significativos. Dessa forma, este valor obtido é bastante expressivo, considerando a variabilidade das amostras ambientais coletadas.

Na análise da PCA, os pesos de cada variável foram calculados e são apresentados através de histogramas de *loading* e *scores* (Ver Apêndice D) e, com esses valores foram elaborados os gráficos biplots (Figura III.10) considerando ambos os resultados. Como 92,98% da variabilidade do sistema em estudo é expresso em 3 CPs, construíram-se 3 biplots (CP1 – CP2; CP1 - CP3 e CP2 – CP3), entretanto para discussão dos resultados, somente estão apresentados os biplots CP1 – CP2 e CP1 - CP3, que explicam 73,29% dos resultados. Nos biplots apresentados os Fatores 1, 2 e 3 correspondem respectivamente, as CPs geradas (CP1, CP2, CP3) na análise.



**Figura III.10.** Biplots gerados da análise dos componentes principais (PCA) realizada a partir das concentrações dos estrógenos em águas superficiais do Ribeirão das Cruzes, Rio Bauru e respectivos afluentes.

Nas figuras visualizam-se as relações existentes. As amostras (codificadas) estão dispostas ao longo das componentes principais e as setas indicam o peso das variáveis nas CPs. Observando os biplots nota-se que as variáveis de maior peso na CP1 são a estrona e o etinilestradiol (valores positivos), na CP2 são o estradiol e o estriol (valores positivos) e na CP3 o estradiol (sentido negativo) e o estriol (sentido positivo). Estas informações são úteis para a interpretação do PCA, por exemplo, se algum resultado localiza-se no sentido positivo da CP1 no gráfico de PCA, certamente apresenta maiores concentrações de estrona e/ou etinilestradiol.

Para exemplificar a relação entre loadings e scores podemos observar os pontos “Bf5” e “Bf11”. Ambos localizam-se no sentido positivo da primeira CP e apresentam as maiores contribuições nesse sentido, porque são os pontos que apresentaram maiores concentrações de E1 (10,4 e 16,96 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente) nas amostras ambientais. Quando se observa na mesma figura os pesos na CP2 e na CP3, verifica-se que o ponto “As10” apresenta a maior contribuição, relativa à concentração de 2,56 ng mL<sup>-1</sup> de E2.

A maioria dos pontos relativos ao Ribeirão das Cruzes (Araraquara) localiza-se próximo à origem dos eixos, indicando concentrações menores e maior homogeneidade dos resultados. Observando as figuras é possível observar que o ponto “As14” agrupou com as amostras de Bauru o que deve estar ligado ao fato deste ponto corresponder à jusante da ETE Araraquara, que, embora trate o efluente, este ainda pode conter concentrações elevadas dos estrógenos, pois na maioria dos casos, o tratamento é ineficiente para remoção de orgânicos.

#### **4.4.1.2. Análise de agrupamentos hierárquicos (HCA)**

A análise por cluster foi empregada para explorar as diferenças entre as amostras, definindo-as em grupos, considerando simultaneamente todas as variáveis. O dendograma gerado (Figura III.11) a partir da análise de agrupamentos hierárquicos, indica a formação de 3 grupos (*clusters*) principais.



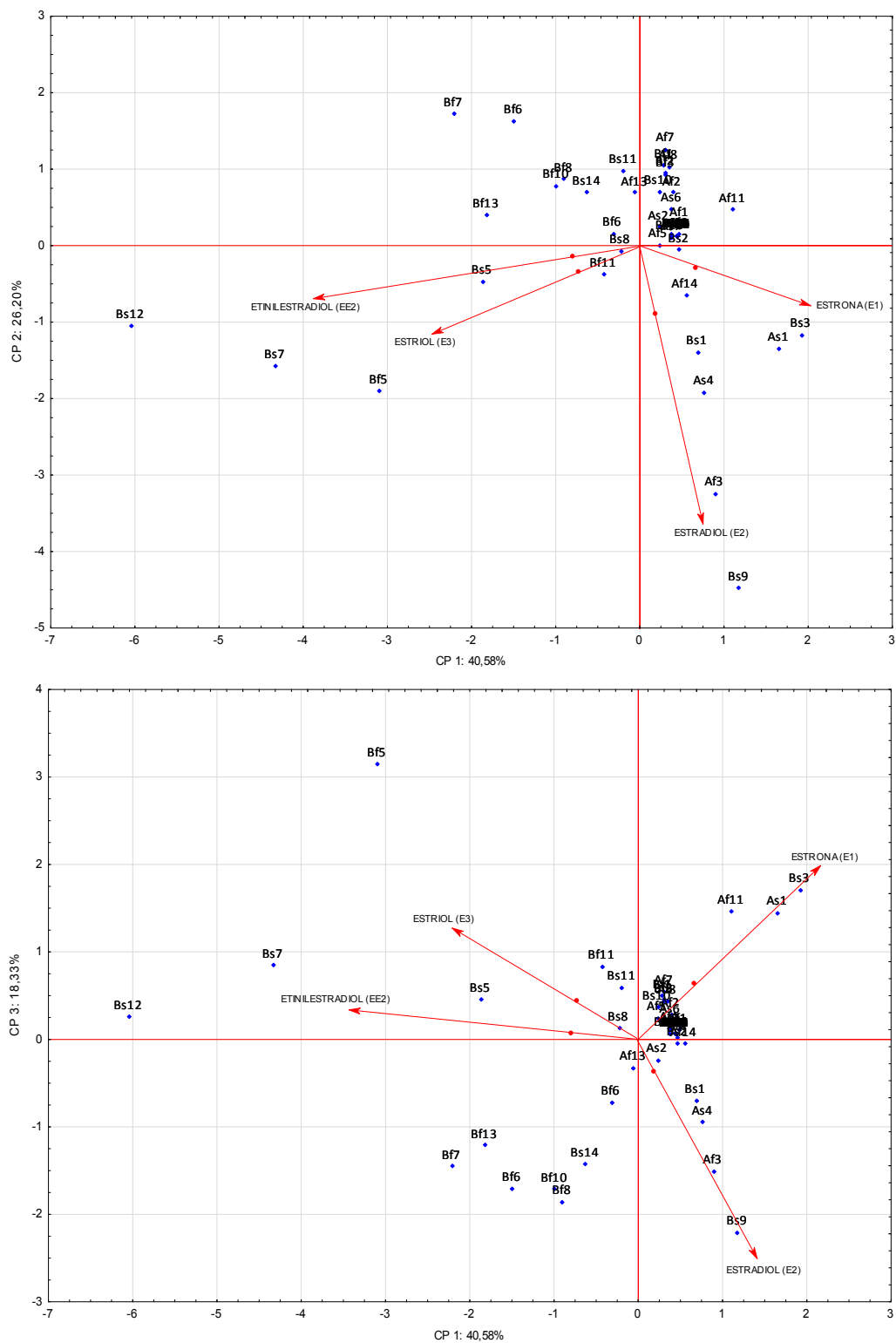
Comparando-se os agrupamentos A e B com o agrupamento C, observa-se que nos primeiros há predominância de amostras de Bauru coletadas em Setembro e de Araraquara realizadas em Fevereiro, enquanto que o inverso ocorre em C (amostras de Bauru de Fevereiro e amostras de Araraquara de Setembro). Tratando-se de corpos hídricos com características diferentes a influência da sazonalidade foi distinta para cada um deles. Em Bauru essa diferença não é tão aparente quanto para Araraquara, como se pode notar pelo agrupamento dos pontos Bf7, Bf8, Bf13, Bs7, Bs8 e Bs13 com similaridade próxima a 100%. Metade dos pontos referentes à cidade de Bauru sofre influência da sazonalidade e correspondem àqueles agrupados no dendograma. Por outro lado, em Araraquara a influência da sazonalidade é maior, comprovados pela separação dos pontos no dendograma.

#### **4.4.2. Material Particulado em Suspensão**

##### **4.4.2.1. Análise dos Componentes Principais**

As componentes principais geradas (CP1, CP2 e CP3) para as amostras de material particulado em suspensão aquático explicaram 40,58%, 26,20% e 18,33%, respectivamente, totalizando 85,11%. As variáveis que possuem maior peso na CP1 são a estrona (valor positivo), estriol e etinilestradiol (valores negativos), na CP2 figura principalmente o estradiol (valor positivo) e na CP3 principalmente a estrona e o estriol (sentido positivo) e o minoritariamente o estradiol (sentido negativo).

Assim como observado para as amostras de água, na análise da PCA, os pesos de cada variável foram calculados e são apresentados através de histogramas de loading e scores (Ver Apêndice E) e, com esses valores foram elaborados os gráficos biplots (Figura III.12) considerando ambos os resultados. Como 85,11% da variabilidade do sistema em estudo é expresso em 3 CPs, construíram-se 3 biplots (CP1 – CP2; CP1 - CP3 e CP2 – CP3), entretanto para discussão dos resultados, somente estão apresentados os biplots CP1 – CP2 e CP1 - CP3.



**Figura III.12.** Biplots gerados da análise dos componentes principais (PCA) realizada a partir das concentrações dos estrógenos em material particulado em suspensão do Ribeirão das Cruzes, Rio Bauru e respectivos afluentes.

Na Figura dos biplots verifica-se que a na CP1 o ponto de amostragem “Bs12” apresenta o maior peso no sentido negativo do histograma, resultado das maiores concentrações de E3 e EE2 nesta amostra. Já para o ponto “Bs9”, que apresenta maior concentração de E2, apresenta maior peso no sentido positivo da CP2 e negativo na CP3. Além disso, verifica-se em todos os gráficos uma maior distribuição homogênea dos dados, por exemplo, as maiores concentrações de E1 são encontradas nas amostras “Af11”, “As1” e “Bs3” quando analisa-se o biplot CP1 – CP2.

Em linhas gerais, nota-se que as amostras de Bauru estão mais dispersas enquanto Araraquara está somente ligeiramente espaçada, porém nada muito significativa. Isso deve estar ligado ao fato desse material particulado retido no filtro corresponder a sólidos suspensos do esgoto e não a sedimentos resuspensos por ações naturais como turbacão.

#### **4.4.2.2. Análise de agrupamentos hierárquicos (HCA)**

Para agrupar as amostras em relação ao local e período de coleta, realizou-se a análise de agrupamentos hierárquicos, cujo dendograma gerado (Figura III.13), indica a formação de 4 grupos (*clusters*) principais.

O agrupamento A é formado exclusivamente por amostras da cidade de Bauru. Seu subgrupo A' agrupou os pontos com as menores concentrações de E1 quantificadas (4,34 – 32,14 ng g<sup>-1</sup>) enquanto que em A'' tem-se pontos com concentrações elevadas de E3 e EE2 sendo este último em concentrações mais elevadas em relação ao primeiro.



#### 4.4.3. Correlação: local de amostragem x período de coleta

De maneira geral não se observa a mesma tendência generalizada de separação em função do período de coleta, conforme observado nas amostras de água. As amostras de Araraquara apresentaram menor variação, enquanto que as amostras de Bauru encontraram-se mais dispersas nos agrupamentos. Com o intuito de complementar as informações originadas nas análises multivariadas, PCA e HCA, foi elaborada uma figura relacionando diretamente os locais em função do período sazonal de realização da amostragem. Na Figura III.14 observa-se as correlações dos resultados encontrados nos pontos de coleta na cidade de Araraquara e Bauru, confrontando os períodos de Fevereiro e Setembro.

	Araraquara				Bauru		
	Água	MP			Água	MP	
Af1	0,8	1,0	As1	Bf1	0,8	-0,8	Bs1
Af2	-0,4	0,6	As2	Bf2	0,3	0,3	Bs2
Af3	0,3	-0,3	As3	Bf3	0,3	1,0	Bs3
Af4	-0,2	-0,4	As4	Bf4	1,0	1,0	Bs4
Af5	-0,9	0,7	As5	Bf5	1,0	1,0	Bs5
Af6	-0,5	0,8	As6	Bf6	0,9	0,8	Bs6
Af7	-0,4	0,8	As7	Bf7	0,9	0,9	Bs7
Af8	-0,4	0,7	As8	Bf8	0,9	-0,6	Bs8
Af9	-0,5	1,0	As9	Bf9	0,3	-0,3	Bs9
Af10	-1,0	1,0	As10	Bf10	0,2	-0,8	Bs10
Af11	-0,8	0,6	As11	Bf11	0,5	0,4	Bs11
Af12	-0,4	1,0	As12	Bf12	0,2	-1,0	Bs12
Af13	0,2	1,0	As13	Bf13	0,7	-1,0	Bs13
Af14	0,1	0,1	As14	Bf14	1,0	0,2	Bs14
Af15	0,7	1,0	As15	Bf15	0,8	1,0	Bs15
				Bf16	1,0	1,0	Bs16

1,00	0,80	0,60	0,40	0,20	0,00	-0,20	-0,40	-0,60	-0,80	-1,00
corr. alta positiva			corr. baixa/nula			corr. média negativa				

**Figura III.14.** Índice de correlação entre as amostras de água e material particulado em suspensão coletadas no Ribeirão das Cruzes (Araraquara) e Rio Bauru (Bauru) e respectivos afluentes em diferentes períodos.

Para as amostras de água coletadas na cidade de Araraquara, com exceção aos pontos “P1 - Represa” e “P15 – Salto grande” a influência da sazonalidade é expressiva, pois os demais locais de amostragem apresentaram correlações baixas/negativas, indicando que há contraste de resultados para os dois períodos de

coleta. Na comparação dos resultados de “material particulado” verifica-se que existe maior homogeneidade de dados, com a maioria dos resultados apresentando valores de correlações altas. As maiores variações (consequência das baixas correlações) ocorrem nos pontos relativos à “ETE Jusante”, “Tanquinho” e “Serralhado”.

Para as amostras de água coletadas na cidade de Bauru, são encontradas baixas correlações somente nos pontos P2 – Forquilha, P3 – Ressaca + Forquilha, P9 – Castelo, P10 – Rio Bauru e P12 – Água Comprida. Nos demais locais de amostragem, há correlações altas, não indicando grandes contrastes em relação às épocas de coleta, quando comparadas os resultados determinados em águas. Esse comportamento pode estar associado ao aporte contínuo de grandes volumes do efluente não tratado da cidade, ou seja, como a descarga é elevada em qualquer época do ano, a distribuição desses compostos no corpo hídrico não sofre influência de períodos chuvosos ou de seca. Para os resultados determinados em amostras de material particulado na mesma cidade, existe maior número de pontos de coleta com correlações baixas que pode ser influenciado pelo fator “período de coleta”. Os pontos P3, P4, P5, P6, P7, P15 e P16 apresentam altas correlações, entretanto os demais apresentam resultados que indicam maior dissimilaridade, quando comparadas as épocas de coleta.

### Considerações do Capítulo III

A análise das amostras ambientais realizadas em condições climáticas diferentes detectou a presença de pelo menos um estrógeno em aproximadamente 100% das amostras de água superficial coletadas no Rio Bauru, Ribeirão das Cruzes e respectivos afluentes. No MPS, apenas 21,6% das amostras coletadas apontaram a presença de estrógenos, sendo grande parte encontrada no particulado do Rio Bauru.

Em Araraquara (Ribeirão das Cruzes) a ocorrência dos estrógenos esteve associada em especial às águas superficiais com concentrações entre 0,03 – 2,6 ng mL<sup>-1</sup>. Dos estrógenos quantificados, o natural E3 que corresponde ao produto de degradação do E2, esteve presente em aproximadamente 90% das amostras, o que pode estar intrinsecamente relacionado ao fato desse manancial receber descarga pontual do efluente tratado sem pontos difusos expressivos ao longo do seu curso e de seus afluentes. Por outro lado, foram quantificados todos os estrógenos nas amostras de água coletadas do Rio Bauru em concentrações relativamente maiores em relação ao Ribeirão das Cruzes em virtude da descarga do efluente *in natura* neste manancial. No MPS do Rio Bauru, que provavelmente corresponde aos sólidos suspensos do esgoto, apenas E3 e EE2 foram quantificados em elevadas concentrações.

De maneira geral, infere-se que as quantidades de E1, E2, E3 e EE2, obtidos nos mananciais para as amostras de água (0,02 – 17 ng mL<sup>-1</sup>) e material particulado (758,4 – 14403,8 ng g<sup>-1</sup>) medidos durante as coletas sazonais podem induzir efeitos estrogênicos em peixes, como vitelogênese e feminização provocando, a longo prazo, impactos negativos sobre a sustentabilidade do ambiente aquático.

## **CAPÍTULO IV**

### **Ensaio ecotoxicológico *in vivo* e *in vitro***

## 1. Introdução

### 1.1. Avaliação de impacto ambiental: bioensaios

Como os organismos estão em contato direto com a fase aquosa e sólida do ecossistema aquático, é recomendado avaliar a toxicidade da água, sedimento e material particulado por análise química combinada aos bioensaios. Essa toxicidade é definida como uma resposta biológica produzida por um contaminante ou mistura deles a um ensaio particular de exposição, seja *in vivo* ou *in vitro*.

Até o momento foi desenvolvida uma variedade de ensaios *in vivo* e *in vitro*, com o objetivo de avaliar o impacto ambiental de substâncias tóxicas. Os ensaios *in vivo* avaliam vários parâmetros, como massa de órgãos sexuais, diferenciação celular, expressão de proteínas e atividade enzimática (GRAY et al., 1997; BAKER, 2001) enquanto os ensaios *in vitro* são baseados em mecanismos de ação que elucidam respostas e utilizam pontos mais definidos do que os ensaios *in vivo*.

Em linhas gerais, considerando o fato de que o compartimento aquático recebe diversos tipos de contaminantes orgânicos hidrofóbicos, os bioensaios *in vitro* de avaliação da atividade estrogênica podem ser usados para estimar a estrogenicidade total de amostras ambientais contendo as misturas de contaminantes, mas dificilmente será possível atribuir esses efeitos estrogênicos aos componentes exatos e estimar suas contribuições para o mesmo (LUO, 2011). Por outro lado, os bioensaios *in vivo* de avaliação dos efeitos biológicos através de biomarcadores bioquímicos são importantes para elucidar os mecanismos iniciais em níveis moleculares e/ou celulares de resposta rápida na presença de contaminantes. Sendo assim, uma combinação de bioensaios e análises químicas tem sido considerada como uma ferramenta poderosa para caracterizar em misturas complexas os agentes causadores da atividade estrogênica e alterações fisiológicas que podem gerar o stress oxidativo.

## 2. Revisão da Literatura

### 2.1. Ensaios ecotoxicológicos

A presença de microcontaminantes como os estrógenos naturais e sintéticos no compartimento aquático provoca efeitos adversos em peixes evidenciados principalmente pela indução da vitelogenina (proteína presente em fêmeas) no plasma de machos, redução do índice gonadossomático e mobilidade do esperma, e alterações hormonais diversas (CHEN, 2012). Além disso, já foi relatado que os esteroides podem alterar a atividade do citocromo P450 na isoforma CYP1A (YAN et al., 2013).

A combinação de análises químicas com ensaios biológicos *in vitro* e/ou *in vivo*, é utilizada como ferramenta para avaliar o potencial tóxico de muitas substâncias no ambiente e fornecer informações complementares para a avaliação do risco ecológico da contaminação encontrada (DUONG et al., 2010a; WANG et al., 2011).

#### 2.1.1. Teste de estrogenicidade - Recombinant Yeast Assay (RYA)

Os bioensaios *in vitro*, principalmente aqueles baseados nos mecanismos de ação dos estrógenos, são importantes para identificar e avaliar os estrógenos ambientais, pois representam meios eficazes e eficientes de avaliação rápida da estrogenicidade de um grande número de amostras ambientais (ZACHAREWSKI, 1997; CÉSPEDES et al., 2004). Porém, é essencial estar atento à interpretação dos resultados uma vez que a informação gerada é geralmente mais indistinta quando comparada as experiências em animais, ou seja, os ensaios *in vitro* avaliam a atividade estrogênica total de uma amostra.

A maioria desses ensaios *in vitro* está classificada dentro de uma das três categorias: a) ensaios de ligação competitiva ao receptor de estrógeno humano (REh), que verificam a afinidade de ligação de um composto químico ao RE; b) ensaios de informação gênica, que determinam se a transcrição e tradução gênica são dependentes da interação do RE com seu ligante; e c) ensaios de proliferação celular,

que avaliam o aumento do número de células alvo, durante a fase exponencial de proliferação (FANG et al., 2000).

No ensaio com levedura recombinante, ou simplesmente ensaio RYA (do inglês, *Recombinant Yeast Assay*), a atividade estrogênica é resultado da interação direta com o RE (WANDA et al., 2006). Este teste inclui a utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada para expressar dois elementos genéticos: um gene sensor, o RE, e um gene repórter, contendo o elemento responsivo a estrógeno do gene da vitelogenina B1 de *Xenopus laevis*, o qual promove a expressão da enzima  $\beta$ -galactosidase pela ativação do gene lacZ (BOLDRIN et al., 2013; GARCIA-REYERO et al., 2001; 2005).

O gene repórter é construído de uma forma que esta enzima só será expressa na presença do complexo receptor-ligante, imitando o mecanismo pelo qual muitos genes responsivos a hormônios são regulados nos vertebrados (CÉSPEDES et al., 2005; NOGUEROL et al., 2006). A expressão do gene repórter é então monitorada por sua atividade enzimática utilizando substratos, cujos produtos são fáceis de detectar e quantificar (NOGUEROL et al., 2006). Neste teste, é utilizado como substrato 4-metilumbeliferona  $\beta$ -D-galactopiranosídeo (MuGal), cuja hidrólise promove a formação de um produto fluorescente 4-metilumbeliferona, medido em espectrofotômetro (355 nm de excitação e 460 nm de emissão). Uma curva dose-resposta relacionando a atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase com a concentração de estradiol é usada para atribuir um valor estradiol-equivalente (EEQ) (NOGUEROL et al., 2006; FERNANDEZ et al., 2009).

Metzger et al. (1988) *apud* Graumann e colaboradores (1999) demonstraram as mesmas funções do REh em levedura, o que torna possível utilizar células leveduriforme para esses tipos de ensaios *in vitro*. Além disso, a levedura não tem um sistema endógeno homólogo de receptores nucleares de vertebrados que poderiam interferir com o ensaio e o processo de alteração conformacional e pós-transducional da proteína de vertebrados em levedura é muito semelhante ao das células de mamíferos, o que resulta na preservação da estrutura do receptor quando expresso em levedura (RESENDE, 2011).

A estrogenicidade de um composto ou amostra ambiental pode variar, devido as diferenças na afinidade e ativação do receptor ou a ativação/desativação de vias não mediadas pelo receptor de tradução do gene repórter (JAROSOVÁ et al., 2014). Os alteradores endócrinos, por exemplo, apresentam tal atividade, devido entre outros parametros, a semelhanças estruturais com o estrógeno natural 17 $\beta$ -estradiol, principalmente pela presença de grupos fenólicos (GRAUMANN, 1999).

Os ensaios *in vitro* constituem uma alternativa rápida de triagem quando comparados com estudos *in vivo* ou cultura de células uma vez que são mais simples e mais fácil de realizar (PASSOS et al., 2009). Além disso, permitem a avaliação de um grande número de amostras ambientais e substâncias químicas a um baixo custo (CÉSPEDES et al., 2004), é específico, sensível e reprodutível (PASSOS et al., 2009), tem um tempo experimental relativamente curto e não exige técnica asséptica rigorosa quando comparado a outros ensaios de células cultivadas (KAMATA et al., 2011).

### **2.1.2. Biomarcadores de contaminação aquática**

Devido à ampla distribuição em diversos habitats aquáticos, os peixes possuem papel ecológico fundamental sendo considerados excelentes modelos experimentais para estudos de toxicologia aquática, pois alertam sobre o potencial de perigo de substâncias químicas ou para a evidência da poluição ambiental (MASCHIO, 2009; VAN DER OOST et al., 2003).

Uma vez no ambiente aquático, os compostos hidrofóbicos podem ser absorvidos pelos peixes por quatro vias: alimentação, brânquias, ingestão da água e através da pele. Uma vez incorporados, os poluentes podem ser acumulados nas brânquias, fígado, rim, intestino e músculo. As alterações enzimáticas nos tecidos hepático e branquial são amplamente utilizadas para predizer o potencial tóxico dos contaminantes principalmente porque brânquias estão em contato permanente com o ambiente aquático e apresentam uma área superficial muito grande, representada pelas lamelas. Já o fígado é o primeiro órgão na biotransformação dos xenobióticos, de modo que suas células ficam expostas a um nível elevado de agentes químicos que podem estar presentes no meio ambiente ou em outros órgãos do peixe (SILVA, 2004).

Além do efeito na mortalidade, mais comumente avaliado, é possível também estimar alterações nas condições fisiológicas e/ou metabólicas dos indivíduos através da medida de parâmetros biológicos denominados indicadores biológicos ou biomarcadores (AMORIM, 2003; SANCHES, 2014).

Segundo Van der Oost (2003) biomarcadores são medidas em fluidos corporais, células ou tecidos que podem indicar modificações bioquímicas ou celulares resultantes da exposição a agentes externos, tais como contaminantes. Os biomarcadores estão subdivididos em três classes: **de exposição** (ou acumulação), onde ocorre a mensuração da substância em órgãos-alvo através de determinações analíticas ou bioquímicas; **de efeito** (ou impacto), com avaliações bioquímicas e fisiológicas; e **de susceptibilidade**, onde a exposição altera o funcionamento/expressão normal do organismo (SANTOS, 2012). Dentre os biomarcadores bioquímicos de efeito mais estudados na avaliação da ação tóxica de poluentes em organismos aquáticos, estão enzimas de biotransformação e parâmetros de estresse oxidativo.

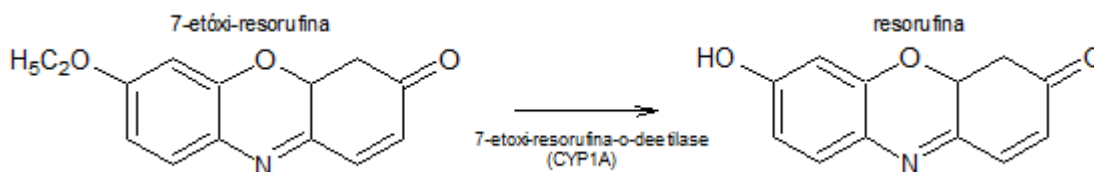
Na presença de contaminantes, o metabolismo de detoxificação dos organismos aquáticos age de forma a eliminar esses compostos, transformando-os em substâncias mais polares através de reações catalisadas por enzimas, facilitando a excreção e eliminação (RAMSDORF, 2011). As enzimas envolvidas nesse processo de biotransformação são as de Fase I (reações de oxidação, redução e hidrólise) e de Fase II (reações sintéticas ou de conjugação). Na Fase III do mecanismo de detoxificação ocorre excreção dos metabólitos gerados nas etapas anteriores.

#### **2.1.2.1. Fase I**

As reações da fase I são catalisadas pelas enzimas do citocromo P450, que são hemoproteínas ligadas à membrana, localizadas predominantemente no retículo endoplasmático de células hepáticas (VAN DER OOST, 2003). Em peixes, a principal função do sistema metabólico de fase I é frequentemente mensurada através da atividade da EROD (7 – etoxiresorrufina-O-deetilase) (LENNQUIST et al., 2008; SOLÉ et al., 2010), considerada como um marcador bioquímico de exposição a

contaminantes orgânicos. Essas enzimas de fase I são responsáveis pela metabolização de compostos endógenos e xenobióticos, tornando-os hidrofílicos. Isto facilita sua eliminação da célula através de sistemas de transporte tipo ABC ou pela conjugação através de enzimas de fase II.

O complexo multienzimático P450 possui diferentes isoformas (subfamílias). A EROD corresponde a isoforma 1A do citocromo P450 (CYP1A) quando age sobre o substrato 7-etóxi-resorufina para produzir a resorufina, que pode ser mensurada por espectrofluorometria (Figura IV.1).

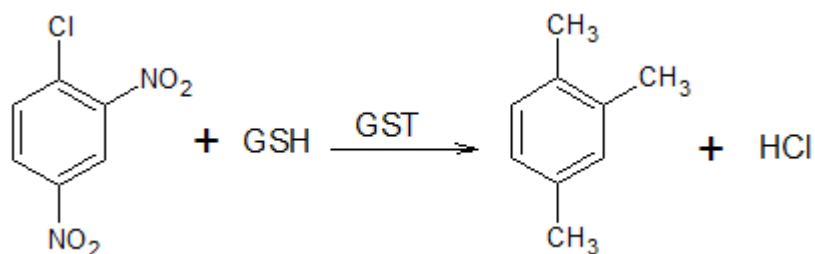


**Figura IV. 1.** Ação da EROD sobre o substrato 7-etóxi-resorufina. Adaptado de Whyte et al. (2000).

A atividade da EROD é uma medida catalítica sensível para determinar a resposta do sistema cytP450 em peixes. Essa atividade é altamente induzida pela presença de HPAs, PCBs e dioxinas (NOGUEIRA, 2008; VAN DER OOST et al., 2003).

### 2.1.3.2. Fase II

O metabolismo da fase II está associado a enzimas de conjugação, tais como a glutationa-s-transferase (GST), responsável pela conjugação da glutationa reduzida (GSH) com uma variedade de compostos eletrofílicos provenientes da Fase I (Figura IV. 2) sendo também importante no processo de detoxificação de xenobióticos, tornando-os mais hidrofílicos, permitindo que o sistema de transporte elimine estes conjugados para o meio extracelular (TREVISAN, 2008; SILVA, 2007). Pode ser considerada uma importante enzima de defesa celular contra ambientes oxidantes, auxiliando os organismos na adaptação a novas condições de exposição (OLIVEIRA et al., 2010).



**Figura IV. 2.** Reação da GSH com o substrato CDNB catalisada pela GST. Adaptado de Nogueira (2008)

A atividade de GST<sub>total</sub> é medida utilizando o substrato artificial 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) por apresentar vasta detecção para a maioria das isoformas de GSTs. Essa atividade pode ser induzida pela presença de HPAs, PCBs, OCPs e PCDDs (VAN DER OOST, 2003).

A GST e o citocromo P450, por serem enzimas sensíveis a compostos exógenos, têm sido amplamente utilizados como biomarcadores de biotransformação (TREVISAN, 2008).

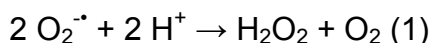
### 2.1.2.3. Parâmetros de estresse oxidativo

Durante o processo de biotransformação pode ocorrer a geração dos radicais hidroxil e íon superóxido, além de peróxido de hidrogênio. Essas espécies são conhecidas como espécies reativas de oxigênio (ERO) (CONSTANTINI, 2010; SILVA, 2007). Por sua vez, as enzimas do sistema de defesa antioxidante atuam para combater as EROs e minimizar os danos oxidativos causado por elas. Em outras palavras, as enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) formam um sistema de defesa que tende a diminuir a concentração de oxi-radicaís, através da conversão de radicais reativos em moléculas não reativas (VAN DER OOST, 2003).

Um desbalanço entre a produção das EROs e a atuação de enzimas antioxidantes gera o estresse oxidativo (SANCHES, 2014). As principais consequências do estresse oxidativo são a lipoperoxidação da membrana celular (LPO), a oxidação de proteínas e as lesões ao DNA e RNA (SILVA, 2007).

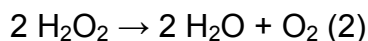
#### 2.1.3.4. Defesas antioxidantes

Entre as principais defesas antioxidantes enzimáticas da célula estão as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). As SOD são metaloenzimas que catalisam a transformação de radicais superóxidos em peróxido de hidrogênio e oxigênio (Equação 1), protegendo as células dos efeitos tóxico desses radicais (VAN DER OOST et al., 2003).



A medida de atividade da SOD é realizada através de ensaios indiretos em que o superóxido  $\text{O}_2^{\cdot -}$  gerado reduz o citocromo c provocando aumento de absorvância em 550 nm. A adição da amostra contendo a SOD promove um decréscimo na velocidade de redução do citocromo c, uma vez que a SOD compete com o mesmo pelo  $\text{O}_2^{\cdot -}$  (NOGUEIRA, 2008).

Para a eliminação de peróxidos existem duas enzimas principais, a CAT e a GPx. A CAT é uma enzima localizada nos peroxissomos das células e fisiologicamente promove a redução do peróxido de hidrogênio produzido pelo metabolismo de ácidos graxos em água e oxigênio molecular (Equação 2) (VAN DER OOST, 2003).



Para mensurar da atividade da CAT é comumente utilizado um ensaio que acompanha espectrometricamente (240 nm a 30°C) a velocidade de decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela enzima.

A GPx, por sua vez, catalisa a redução de peróxido de hidrogênio bem como uma variedade de peróxidos lipídicos em seus álcoois correspondentes usando elétrons da GSH gerando assim, glutathiona dissulfeto (GSSG) (Equação 3) (ZHANG et al., 2004; NORDBERG e ARNER, 2001).



Embora não seja exatamente uma enzima de defesa antioxidante, a GR é importante para manter a homeostase entre glutathiona reduzida e dissulfeto (GSH/GSSG) sob condições de estresse oxidativo. Para evitar a depleção da GSH e aumento da GSSG, a glutathiona redutase (GR) reduz a GSSG à custa de NADPH, regenerando a GSH e mantendo desta forma o estado redox intracelular (TREVISAN, 2008). A atividade da GR pode ser medida espectrometricamente pelo decréscimo nos níveis de NADPH, consumido pela enzima ao converter GSSG em 2GSH.

Da mesma forma, a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) não deixa de estar envolvida com as defesas antioxidantes, pois fornece os equivalentes redutores (NADPH) para regeneração de GSSG. Quando o fornecimento de NADPH fica prejudicado, a função antioxidante da glutathiona também fica afetada, pois a GSSG não pode ser regenerada, causando sérios danos ao metabolismo celular. Neste sentido, a G6PDH também pode ser considerada uma enzima antioxidante co-adjuvante (TREVISAN, 2008). Ainda, é importante ressaltar que a G6PDH fornece NADPH também para as reações de biotransformação catalisadas pelos citocromos P450.

#### **2.1.3.5. Lipoperoxidação**

A presença das EROs podem causar danos ao DNA, às proteínas e aos lipídeos, afetando diretamente a permeabilidade das membranas celulares pelo processo de peroxidação lipídica (SANCHES, 2014). Entre os produtos finais formados durante o processo de lipoperoxidação, destacam-se compostos como cetonas e aldeídos, tal como o malondialdeído (MDA) que pode ser quantificado e usado como indicativo de estresse oxidativo (VAN DER OOST et al., 2003).

O MDA pode atacar proteínas quando presente em ambientes de baixo pH, reagir com bases de DNA gerando lesões mutagênicas e pode ser mensurado por meio da reação com o ácido tiobarbitúrico sob altas temperaturas e baixo pH, gerando um produto com cor que pode ser detectada em 532 nm, sendo usado como um indicador de lipoperoxidação (TREVISAN, 2008).

### 3. Materiais e Métodos

Para o ensaio com levedura recombinante (RYA) e testes toxicológicos *in vivo* foram escolhidos apenas três pontos amostrais de cada manancial, inseridos no estudo analítico, de forma que fornecesse uma visão prévia da situação ambiental e possível contaminação aquática causada pelo lançamento de efluente doméstico seja tratado ou não tratado.

#### 3.1. Ensaio de estrogenicidade *in vitro* – RYA

Para avaliação do potencial estrogênico das amostras ambientais o experimento foi realizado utilizando a linhagem BY4741 da levedura *S. cerevisiae* contendo o gene do receptor de estrógeno humano. Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Mutagenicidade da Faculdade de Ciências Farmacéuticas – UNESP – Campus Araraquara, coordenado pela Profa. Dra. Eliana Varanda, seguindo o protocolo descrito por Garcia-Reyero et al. (2005).

A levedura BY4741 foi descongelada do estoque à -70°C, semeada em meio mínimo sólido, suplementado com 0,1 g/ L de marcadores prototróficos necessários - histidina e metionina), utilizando a técnica de esgotamento por estrias e incubada a 30°C, por 2-3 dias para obtenção de colônias isoladas. A seguir, uma colônia isolada da placa de meio mínimo foi subcultivada em 3 mL de meio rico (YPD – Yeast Nitrogen Base) líquido por 16 horas. Então, 10 µL dessa cultura foram inoculados em 30 mL de meio mínimo líquido, o qual foi incubado a 30°C por aproximadamente 14 horas. A cultura final foi ajustada a uma densidade óptica (DO 600nm) de 0,1 (NOGUEIROL et al., 2006).

Dessa cultura final foram adicionados 90 µL na primeira linha e 50 µL nos demais poços de uma placa de microtitulação de polipropileno de 96 poços (NUNC, Roskilde, Dinamarca), previamente siliconada. Em seguida, 10 µL das amostras de água superficial e material particulado submetidas ao processo de extração dos estrógenos, ressuspendidas em dimetilsufóxido (DMSO), foram adicionados na primeira linha, e posteriormente submetidas à diluição seriada, transferindo-se

sequencialmente 25  $\mu\text{L}$  do poço anterior para o próximo, para que no final todos os poços contenham 50  $\mu\text{L}$  e diferentes diluições das amostras, com fatores de diluição de 1:10, 1:30, 1:90, 1:270 e 1:810. Como controles negativo e positivo foram utilizados o solvente da amostra (DMSO à 10%) e 17- $\beta$ -estradiol (Sigma Aldrich - Brasil) 10 nM, respectivamente. As placas foram incubadas por 6 horas a 30°C, sob agitação suave.

Após a incubação, 50  $\mu\text{L}$  de tampão de lise (Y-PER, Pierce, Rockford, IL, EUA) foram adicionados a cada poço e novamente incubados a 30°C por 30 minutos. Posteriormente, 50  $\mu\text{L}$  de solução tampão suplementado com MuGal foram adicionados às células lisadas. Após breve centrifugação, as placas foram lidas em um espectrofotômetro em comprimentos de onda de 355 nm de excitação e 460 nm de emissão e os valores da atividade da  $\beta$ -galactosidase foram calculados pelo aumento das unidades de fluorescência em relação ao tempo, usando o método de regressão linear padrão. Os valores de estrogenicidade foram descritos como equivalentes de estradiol (EEQ) ng L<sup>-1</sup>, que é definido como a concentração de estradiol que induz a mesma resposta que a amostra no ensaio RYA.

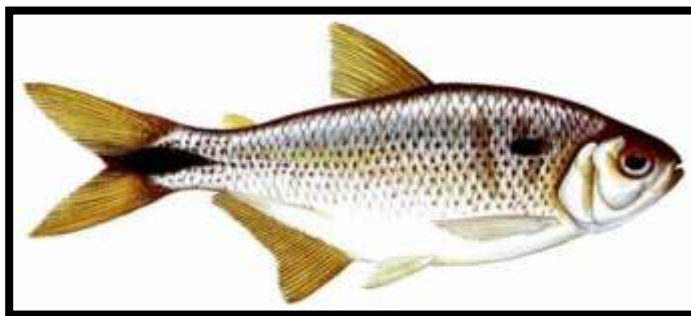
### **3.2. Biomarcadores bioquímicos *in vivo***

Esta parte do trabalho de tese foi efetuada no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática – LABCA/IBILCE/UNESP – Campus São José do Rio Preto, coordenado pelo Prof. Eduardo Alves de Almeida. Para este ensaio, a coleta foi realizada somente em Outubro, pois em Fevereiro estava chovendo fortemente na cidade de Bauru com pontos de alagamento, impossibilitando a amostragem. Foram coletados 60 litros de água em cada sítio amostral, utilizando garrafão de polipropileno (capacidade 20 litros), previamente limpo com detergente neutro, água corrente e acetona.

#### **3.2.1. Obtenção e manutenção dos organismos teste**

Os peixes da espécie *Astyanax* sp. (lambari) (Figura IV. 3) foram adquiridos na Casa das Iscas, localizada na cidade de São José do Rio Preto/SP e mantidos em adaptação às condições do laboratório durante o período de aproximadamente um

mês. Os lambaris foram expostos a água do rio dos mananciais de Araraquara e Bauru em aquários experimentais por cinco dias. Foram coletados fígado e brânquias de cada organismo para análise das enzimas 7-etoxiresorufina-0-deetilase (EROD), glutathione-S-transferase (GST), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e malondialdeído (MDA).



**Figura IV. 3.** Peixe da espécie *Astyanax sp.* utilizado neste trabalho.

### **3.2.2. Exposição dos organismos testes**

A exposição foi feita em aquários de 40 cm x 24 cm x 19 cm (~18 litros), mantidos em aeração constante. Em cada aquário foram adicionados 9 litros de água e, devido ao pouco volume de amostra de tecido (fígado e brânquias) possível de se extrair de cada peixe, cada aquário recebeu três peixes (uma amostra é representada pelo pool de três animais) e cada grupo experimental foi constituído de cinco aquários (n=5). No total, o experimento contou com 7 grupos experimentais (Figura IV.4), conforme descrição do Quadro 1.



Figura IV.4. Esquema da montagem dos experimentos de exposição *in vivo*. Adaptado de Lima, 2011.

**Quadro 1.** Descrição dos grupos experimentais utilizados para os ensaios com biomarcadores bioquímicos.

<b>Grupo I</b>	Controle: sem adição da água do rio. Utilizou-se água filtrada de poço artesiano
<b>Grupo II</b>	Ponto situado a montante do lançamento de efluente no Ribeirão das Cruzes (Araraquara). Corresponde ao ponto 11.
<b>Grupo III</b>	Ponto situado exatamente a montante do lançamento de efluente no Ribeirão das Cruzes (Araraquara). Corresponde ao ponto 13.
<b>Grupo IV</b>	Ponto situado exatamente a jusante do lançamento de efluente no Ribeirão das Cruzes (Araraquara). Corresponde ao ponto 14.
<b>Grupo V</b>	Ponto onde tem início o Rio Bauru. Corresponde ao ponto 3.
<b>Grupo VI</b>	Primeiro ponto no perímetro urbano sob influência de efluente. Corresponde ao ponto 5.
<b>Grupo VII</b>	Ponto situado a jusante dos lançamentos de efluente ao longo do Rio Bauru. Corresponde ao ponto 10.

Após o período de exposição, os animais foram coletados, anestesiados por imersão dos peixes em 5 L de água contendo 100 mg L<sup>-1</sup> do anestésico benzocaína, medidos e pesados. Em seguida, foi feito um corte ventral nos animais para a retirada

do fígado e das brânquias que foram imediatamente congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

### **3.2.3. Preparo das amostras**

Os tecidos (fígado e brânquias) foram pesados ( $\sim 150\text{mg}$  de cada) e homogeneizados em 1:4 (m:v) de tampão Tris 50 mM, pH 7,4 contendo inibidor de protease phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF). Para análise da MDA, foram recolhidos 100  $\mu\text{L}$  dessa alíquota e estocados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para obtenção dos microsomas hepáticos, o homogenato foi centrifugado a 10.000 g por 20 minutos ( $4^{\circ}\text{C}$ ), e o sobrenadante foi centrifugado novamente por 50.000 g por 60 minutos ( $4^{\circ}\text{C}$ ) para obtenção da fração citosólica e do pellet microsomal. As atividades enzimáticas de SOD, CAT, GPx, GR, G6PDH e GST foram medidas na fração citosólica. Na porção microsomal analisou-se a atividade da EROD como indicativo de atividade do citocromo P450.

### **3.2.4. Análise dos parâmetros bioquímicos**

#### **3.2.4.1. 7-etoxiresorufina-o-deetilase (EROD)**

A atividade da EROD foi medida em leitor de microplacas por método fluorimétrico na fração microsomal dos extratos proteicos. O método consiste na formação de resorufina, que é fluorescente ( $\lambda_{\text{exc}} = 537\text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{emis}} = 583\text{ nm}$ ), catalisada pela EROD. Foram adicionados aos poços tampão fosfato de potássio 80 mM, pH 7,4, além de solução de 7-etoxiresorufina 335  $\mu\text{M}$ , NADPH 10 mM e extrato microsomal. A reação foi observada por 5 min, a  $30^{\circ}\text{C}$ . Os resultados são expressos em pmol/min/mg de proteína.

#### **3.2.4.2. Glutathione-S-transferase (GST)**

A atividade da GST foi avaliada pelo método de Keen, Habig e Jakoby (1976), adaptado para leitor de microplacas. A amostra foi adicionada a um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,5, 100 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e 100 mM de GSH. O aumento de absorbância foi

acompanhado a 340 nm à temperatura ambiente e a atividade enzimática é proporcional à velocidade de produção do composto conjugado. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

#### **3.2.4.3. Catalase (CAT)**

A atividade da CAT foi medida pelo método de Beutler (1975), quantificando a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima no primeiro minuto da reação, por meio do decréscimo de absorvância em 240 nm a 30°C. O meio de reação continha H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM, Tris 1 M e EDTA 5 mM, pH 8,0. Os valores de atividade da CAT são expressos em U/mg de proteína. Uma unidade de CAT corresponde a quantidade de enzima que hidrolisa 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto, a 30°C em pH 8,0.

#### **3.2.4.4. Glutathiona peroxidase (GPx)**

A análise da GPx foi feita pela técnica de Sies et al. (1979), adaptado para o leitor de microplacas. A atividade é acompanhada indiretamente pelo desaparecimento do NADPH medido através do decréscimo de absorvância a 340 nm, promovido durante a redução da glutathiona oxidada (GSSG). A redução é catalisada por glutathiona redutase (GR) em presença de NADPH a 30°C. O meio de reação continha tampão fosfato de potássio 0,1 M, EDTA 5 mM, pH 7,0, NADPH 20 mM, GR 0,1 U/ml e glutathiona reduzida 0,1 M. Os resultados são expressos em U/mg de proteína.

#### **3.2.4.5. Glutathiona redutase (GR)**

Ao utilizar o substrato GSSG a enzima consome NADPH, que é acompanhado em 340nm. A velocidade de consumo de NADPH, em condições de saturação, expressa a atividade enzimática (CARLBERG e MANNERVIK, 1985). O ensaio enzimático foi realizado em tampão fosfato de potássio 100 mM, EDTA 1mM, pH 7,0 contendo 0,2 mM de NADPH.

#### **3.2.4.6. Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH)**

Na presença de G6PDH, o NADPH é formado a partir de nicotinamida- adenina- dinucleotídeo-fosfato (NADP<sup>+</sup>) e, dessa forma, o aumento da absorvância é medido em 340 nm (GLOCK e MCLEAN, 1953). O ensaio enzimático é realizado em tampão Tris/HCl 50 mM pH 7,4 contendo 0,127 mM NADP<sup>+</sup> e 3 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>). Como substrato iniciador utiliza-se 1,5 mM de glicose-6-fosfato (G6P).

#### **3.2.4.7. Peroxidação lipídica**

Para avaliar os níveis de peroxidação lipídica nos tecidos, foi detectada a presença do produto formado entre o MDA (produto da lipoperoxidação) e o ácido 2-tiobarbitúrico, via HPLC-UV/VIS em 532 nm (ALMEIDA et al., 2003, 2004). Foram adicionados a alíquota recolhida durante o preparo das amostras, 300 µL de solução de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,4% diluído em HCl 0,2M. As amostras foram incubadas por 40 minutos a 90°C. Depois deste período, as amostras de MDA-TBA foram extraídas com 1 mL de n-butanol após centrifugação a 3500 x g por 3 minutos. No HPLC, as amostras de MDA-TBA foram injetadas diretamente (20 µL) e monitoradas a 532 nm a 40°C. A fase móvel consistiu de solução fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,0 com 40% metanol, bombeada isocraticamente (1 mL/min). A coluna utilizada foi uma LC-18 (150 x 4,6 mm, 5 µm de diâmetro de poro). A quantificação do MDA foi feita com base em uma curva padrão, injetando-se previamente no HPLC concentrações conhecidas de MDA-TBA. Os dados são expressos em pmol de TBARS/g tecido (TBARS: thiobarbituric acid reactive substances).

#### **3.2.5. Análise estatística**

Através do programa estatístico STATISTICA 6.0, foram realizados testes para se verificar a normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Levene) dos dados. No caso de dados paramétricos, ou seja de distribuição normal e variância homogênea (p > 0,05), os parâmetros entre os diferentes tratamentos foram comparados por análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey ou Fisher LSD no qual é apontado em entre quais grupos existe a diferença estatística. No caso de dados não normais ou

não homogêneos, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Diferenças significativas entre os grupos foram aceitas com  $p < 0,05$ .

Os dados são apresentados como média mais ou menos o desvio padrão. A atividade das enzimas foi expresso como mU, sendo que uma Unidade foi considerada como a quantidade da proteína que é capaz de consumir 1  $\mu\text{mol}$  de substrato/ml/min de reação.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Atividade estrogênica – RYA

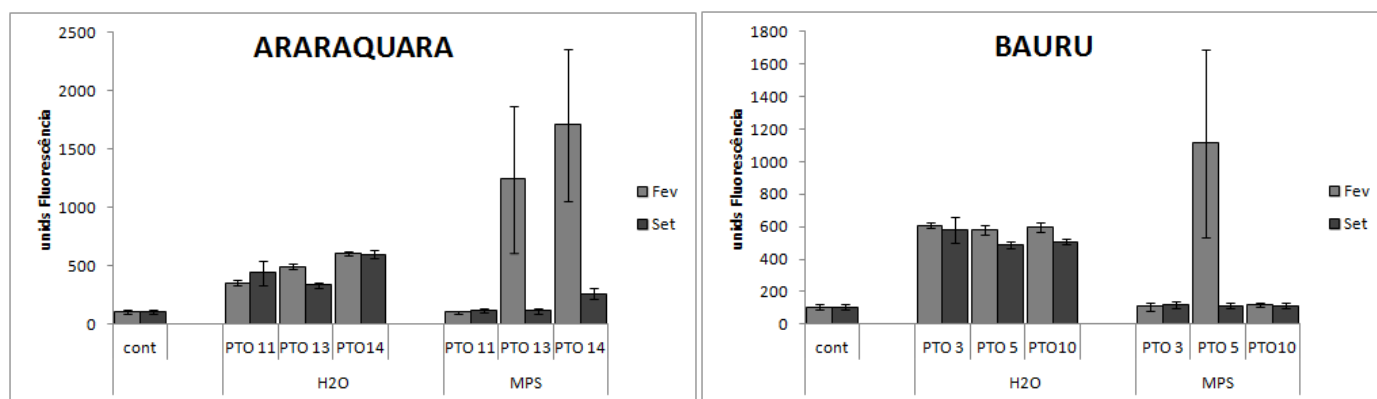
As amostras coletadas (água e MPS) nos pontos selecionados foram submetidas ao processo de extração correspondente e o extrato final seco foi então ressuspendido em dimetilsulfóxido (DMSO) para análise da atividade estrogênica. Em comparação com o estrógeno natural, 17- $\beta$ -estradiol, compostos ou amostras podem ser classificados de acordo com sua potência. Uma vez que os efeitos *in vivo* do 17  $\beta$ -estradiol são bem documentados, este composto funciona como uma referência para a priorização do composto ou identificação dos riscos dos estrógenos ambientais (VANPARYS et al., 2010). Os resultados da avaliação da atividade estrogênica (EEQ nM) obtidos para as amostras testadas foram dispostos na Tabela IV. 1.

**Tabela IV. 1.** Atividade estrogênica expressa em equivalentes de estradiol (EEQ nM)  $\pm$  desvio padrão dos extratos de água superficial e MPS do Ribeirão das Cruzes (Araraquara/SP) e Rio Bauru (Bauru/SP).

	Amostras	Campanha Fev	Campanha Set
<b>ARARAQUARA</b>	P11 H2O	75 $\pm$ 48	4,0 $\pm$ 0,5
	P13 H2O	31 $\pm$ 9	1,0 $\pm$ 0,2
	P14 H2O	880 $\pm$ 244	4,0 $\pm$ 0,4
	P11 MPS	0,77 $\pm$ 1	1,0 $\pm$ 0,3
	P13 MPS	57 $\pm$ 82	0,5 $\pm$ 0,3
	P14 MPS	17 $\pm$ 10	1,0 $\pm$ 0,5
<b>BAURU</b>	P3 H2O	16 $\pm$ 13	43 $\pm$ 23,4
	P5 H2O	nd	263 $\pm$ 242,3
	P10 H2O	nd	97 $\pm$ 156,8
	P3 MPS	0,4 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,3
	P5 MPS	7,0 $\pm$ 1	1,0 $\pm$ 0,05
	P10 MPS	1,0 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,3

Além dos valores de EEQ geral, a atividade estrogênica das amostras foi analisada por meio da avaliação da atividade da enzima  $\beta$ - galactosidase (expressa em unidades de fluorescência), a qual só é expressa quando há na amostra, constituintes

capazes de se ligar aos receptores estrogênicos presentes na levedura modificada. Na Figura IV. 5, pode-se verificar a atividade estrogênica, expressa em unidades de fluorescência, dos extratos de água e MPS, sendo as médias de fluorescência comparadas com as do controle negativo (DMSO a 10%).



**Figura IV. 5.** Atividade estrogênica para amostras ambientais água e MPS em unidades arbitrárias de fluorescência da  $\beta$ -galactosidase. Os valores são médias de 3 experimentos independentes. Controle positivo, 17- $\beta$ -estradiol, FU = 10296  $\pm$  2316.

Os resultados obtidos mostraram potencial estrogênico significativo para as amostras de água superficial coletadas no Ribeirão das Cruzes e Rio Bauru em ambas estações. Embora, nas amostras correspondentes aos dois sítios de amostragem no Rio Bauru (Pto 5 e Pto 10) coletadas no mês de Fevereiro, o valor de EEQ não tenha sido detectado, possivelmente por estar fora da faixa de aplicação do método, ambas amostras foram capazes de gerar ativação da enzima  $\beta$ -galactosidase, quando comparadas ao controle negativo, inferindo um provável potencial estrogênico.

No Ribeirão das Cruzes (Araraquara), os valores de EEQ foram superiores no mês de Fevereiro comparado a Setembro, possivelmente devido à presença do estrógeno natural E3 (0,15 – 0,21 ng mL<sup>-1</sup>) quantificado em todos os pontos amostrais (exceto P14AQA). Embora E3 apresente potencial estrogênico inferior em relação ao E2 (também quantificado), as concentrações detectadas do E3 foram maiores em relação ao E2. Além disso, a presença de outros compostos similares estruturalmente ao estrógeno natural 17  $\beta$ -estradiol, pode conferir potencial estrogênico significativo à

amostra. Dessa forma, infere-se que o maior potencial estrogênico verificado em Fevereiro, pode ser atribuído a combinação de diferentes compostos ao estríol que, juntos, foram mais estrogênicos em relação à Setembro, onde foram detectadas concentrações de E1 superiores (2,3 – 4,1 ng mL<sup>-1</sup>).

Para o Rio Bauru, o potencial estrogênico foi maior em Setembro comparado a Fevereiro, o que pode ser explicado também pela presença do estrógeno natural E3 (0,02 – 0,3 ng mL<sup>-1</sup>) combinado ao sintético 17  $\alpha$ -etinilestradiol (0,16 – 0,2 ng mL<sup>-1</sup>), considerado mais potente e mais estável em água em relação aos estrogênios naturais. Segundo Ferreira (2008), em ensaios *in vitro* a potência estrogênica de 17 $\alpha$ -etinilestradiol é da mesma ordem de grandeza do 17 $\beta$ -estradiol.

Para a maior parte das amostras de material particulado em suspensão os valores de EEQ são baixos e unidades de fluorescência não diferem estatisticamente do controle negativo evidenciando baixo potencial estrogênico com exceção para os pontos 13 e 14 do Ribeirão das Cruzes e ponto 5 do Rio Bauru que expressaram potencial estrogênico significativo no mês de Fevereiro, nos quais nota-se altos valores de EEQ e atividade enzimática estatisticamente significativa quando comparada ao controle negativo. Nesses pontos amostrais foi detectada apenas a presença de E3 no Pto 5 Bau, portanto esse aumento no potencial, possivelmente, está associado a outros compostos.

Dessa forma, é conveniente frisar que este ensaio é um resultado preliminar que aponta somente a presença ou ausência de potencial estrogênico de misturas complexas, como as matrizes de interesse ambiental. É impossível afirmar quais são os agentes causadores uma vez que no RYA qualquer composto estruturalmente semelhante ao hormônio natural 17  $\beta$ -estradiol pode interagir com o RE e induzir a expressão gênica semelhante a do hormônio estrogênio, embora a uma menor afinidade (FERGUSON, 2001). Isso acontece porque os receptores esteroidais são receptores nucleares pouco seletivos. Dessa forma, valores de EEQ elevados evidenciam apenas a presença de compostos com afinidade pelo receptor de estrógeno (ER) presente na levedura. Nesse trabalho, a Correlação de Pearson foi utilizada para estabelecer a relação entre os estrógenos e o potencial estrogênico

(EEQ), porém os resultados não apresentaram relação direta, evidenciando que o ambiente é estrogênico e principalmente que os estrógenos presentes no meio não atuam sozinhos no potencial observado para as amostras do Ribeirão das Cruzes e Rio Bauru, coletadas nas campanhas sazonais.

Por exemplo, observando o ponto mais estrogênico (P14 do Ribeirão das Cruzes) nota-se que o mesmo forneceu como EEQ geral 880,0 nM embora nas análises químicas nenhum dos estrógenos tenha sido detectado. Isso significa que a amostra tem uma atividade estrogênica equivalente a uma concentração de 880,0 nM de estradiol que provavelmente é ocasionado por xenoestrógenos diferentes.

Moura (2009) verificou que o potencial estrogênico de afluente e efluente de ETE da UGRHI – 13 foi atribuído majoritariamente a presença de alquilfenóis nas amostras analisadas. Embora os estrógenos esteróides sejam usualmente responsáveis pela atividade estrogênica (JAROSOVÁ et al., 2014) e alquilfenóis frequentemente apresentem estrogenicidade menor em relação aos estrógenos (BILA e DEZOTTI, 2007), a concentração elevada de alquilfenóis encontrada nas amostras justificaram o efeito da estrogenicidade obtido. Recentemente, Esteban e colaboradores (2014) avaliaram a ocorrência e atividade estrogênica de alteradores endócrinos em rios espanhóis. Os valores de estrogenicidade obtidos também foram atribuídos a elevada concentração de nonilfenol (NP) presente no corpo hídrico.

## **4.2. Enzimas de biotransformação e defesa antioxidantes**

### **4.2.1. Análise da EROD**

A atividade enzimática da EROD foi avaliada em fígado, porém não foi realizada em brânquias de lambaris, em virtude da quantidade insuficiente de amostra para análise de todas as enzimas além de que segundo Whyte et al. (2000), o fígado é o tecido que apresenta maior atividade da EROD.

Em relação ao grupo controle, verificou-se maior expressão de P450 nos peixes dos grupos expostos à água dos mananciais, exceto para os pontos P11 AQA e P5 BAU, nos quais a atividade enzimática foi inibida (Figura IV. 6). A maior atividade

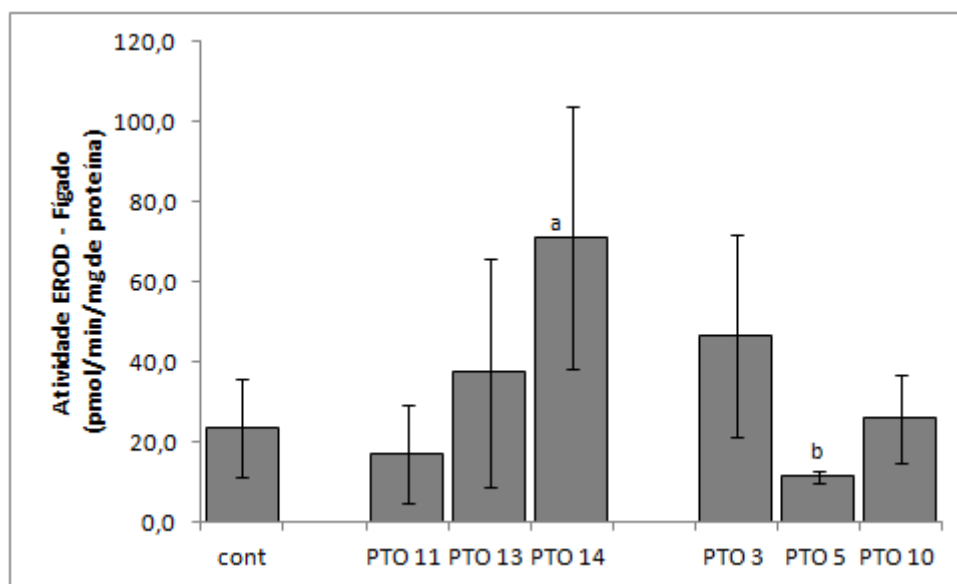
enzimática sinaliza a metabolização de compostos exógenos/xenobióticos, tornando-os hidrofílicos para facilitar sua eliminação pelo organismo.

Especificamente em Araraquara nota-se a indução na atividade dessa enzima, quando a concentração de efluente aumenta (do P11 até o P14), enquanto no Rio Bauru ocorre uma inibição na atividade enzimática quando se percorre o rio. Nesse caso, infere-se que a atividade da EROD pode ser inibida quando o organismo está exposto a altas concentrações e/ou mistura de contaminantes, pois enquanto um composto aumenta a atividade enzimática outro que esteja presente em concentração mais elevada pode inibi-la. Além disso, a inibição enzimática pode estar relacionada a níveis de estresse tão intensos devido à exposição, que os peixes não mais expressam quantidade suficiente da isoforma CYP1A para se detoxificarem. Sole e colaboradores (2000) demonstraram que a atividade da EROD foi reduzida em carpas expostas ao estrógeno sintético 17  $\alpha$ -etinilestradiol.

O contrário acontece no Rio Bauru, que recebe efluente in natura o qual pode conter milhares de compostos com mecanismo de ação distinta sobre a enzima.

Nas figuras mostradas para todas as atividades enzimáticas, ao longo dessa discussão, as letras diferentes significam diferenças estatísticas significativas entre os grupos enquanto as letras iguais correspondem a grupos similares estatisticamente.

O teste de Kruskal-Wallis detectou que existem diferenças entre o ponto que corresponde à jusante do lançamento de efluente em Araraquara (P14 AQA) e o primeiro ponto de do Rio Bauru (P5 BAU) onde nota-se a presença do efluente.



**Figura IV. 6.** Gráfico da atividade enzimática em média  $\pm$  desvio padrão da 7-etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) em fígados após a exposição de lambaris (*Astyanax sp.*) as amostras de água do Ribeirão das Cruzes (AQA) e Bauru (BAU). Letras iguais ou ausência de letras = diferença estatística insignificante. Letras diferentes = diferença estatística significativa.

Estudos de biotransformação em peixes revelaram que a exposição aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) induz um aumento na concentração de CYP1A e, portanto, na sua atividade catalítica (WHYTE et al., 2000; PACHECO e SANTOS, 2001; VAN DER OOST et al., 2003). Segundo Whyte et al. (2000), a indução da CYP1A ocorre quando os organismos são expostos a HPAs, visto que estes compostos se ligam aos receptores aril-hidrocarbonetos sinalizando para que mais CYP1A seja transcrita. Como a região de coleta das amostras está sob influência das queimadas de cana-de-açúcar, cujas partículas em suspensão no ar, contêm HPAs (SILVA et al., 2010; ANDRADE et al., 2010), estes compostos podem estar presentes na água e material particulado dos rios, principalmente na época de setembro, que coincide com a safra desta cultura.

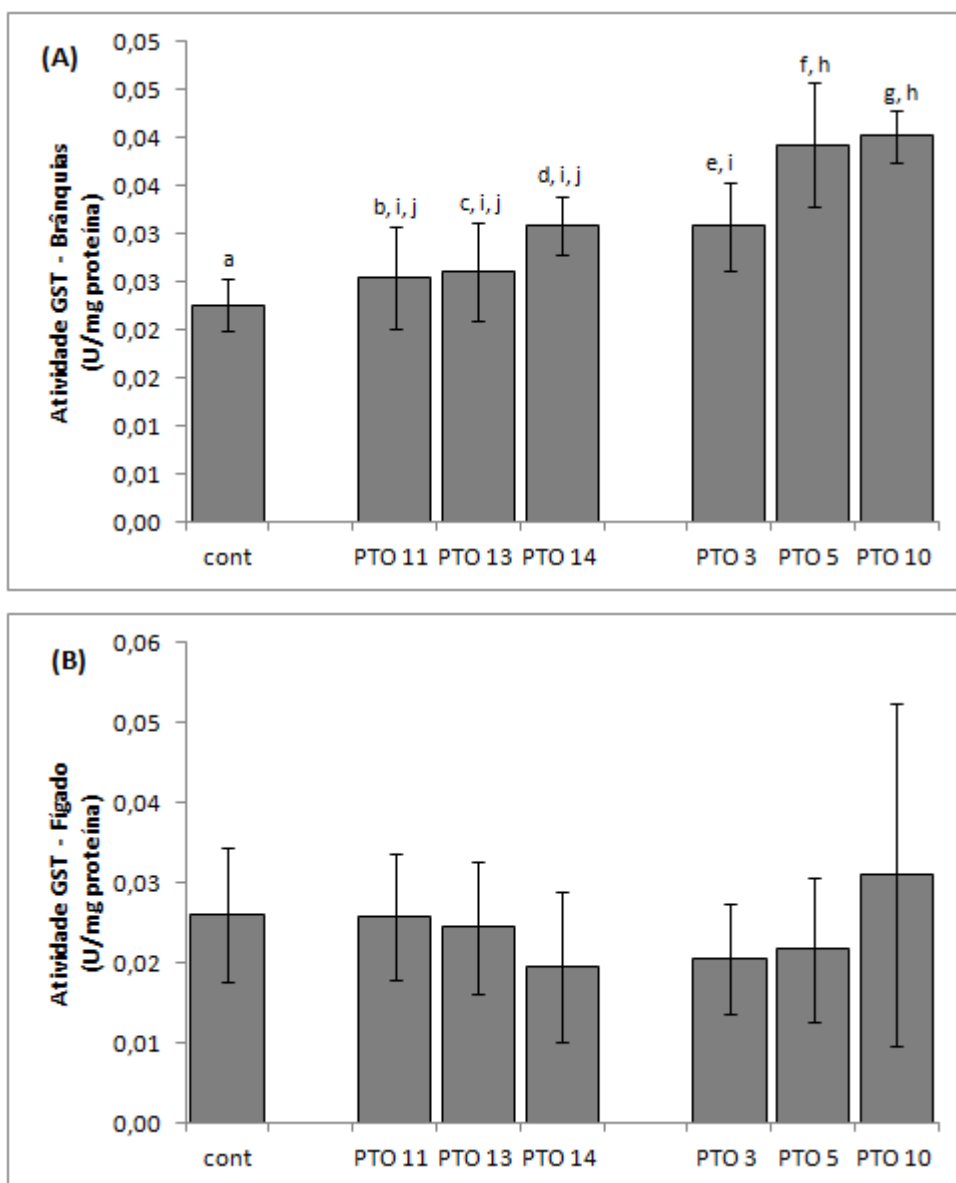
#### 4.2.2. Análise da GST

Em relação à análise da atividade da GST (Figura IV.7), observamos que, em brânquias houve diferenças significativas em relação ao grupo controle negativo e entre os tratamentos, com aumento da atividade enzimática quando os peixes foram

expostos à água do Ribeirão das Cruzes e Rio Bauru influenciando na atividade de detoxificação desta enzima nos tecidos branquiais. Além disso, os pontos de maior concentração de esgoto doméstico (P5 e P10 BAU) no Rio Bauru são diferentes estatisticamente dos demais pontos de amostragem, mas são semelhantes entre si. Além disso, está claro que houve maior atividade de GST nos grupos expostos a água do Rio Bauru, exceto para o P3 que não apresentou diferenças significativas da atividade desta enzima nas brânquias de animais expostos a água do Ribeirão das Cruzes.

Os tecidos branquiais são muito importantes na respiração, osmorregulação e excreção e como representam uma grande superfície de contato com o meio, o aumento da atividade enzimática nesse tecido pode ser maior em relação aos tecidos hepáticos, de forma a facilitar o processo de excreção dos compostos metabolizados diretamente na água (NOGUEIRA, 2008). Além disso, as brânquias são geralmente a porta de entrada da maior parte dos compostos tóxicos nos peixes, fazendo contato direto com o meio externo, salientando o papel da GST nas brânquias na proteção do organismo contra os efeitos dos xenobióticos.

Para a GST hepática (Figura IV.7 B) não foram detectadas diferenças estatísticas significantes embora tenha sido observado um aumento na atividade enzimática em peixes expostos a água correspondente ao último ponto do Rio Bauru (P10), pois a carga orgânica deste local de amostragem encontra-se à jusante dos pontos 3 e 5, ou seja, é resultado da somatória dos mesmos.



**Figura IV. 7.** Gráficos da atividade enzimática em média  $\pm$  desvio padrão da glutiona-S-transferase (GST) em brânquias (A) e fígados (B) após a exposição de lambaris (*Astyanax sp.*) as amostras de água do Ribeirão das Cruzes (AQA) e Bauru (BAU). Letras iguais ou ausência de letras = diferença estatística insignificante. Letras diferentes = diferença estatística significativa.

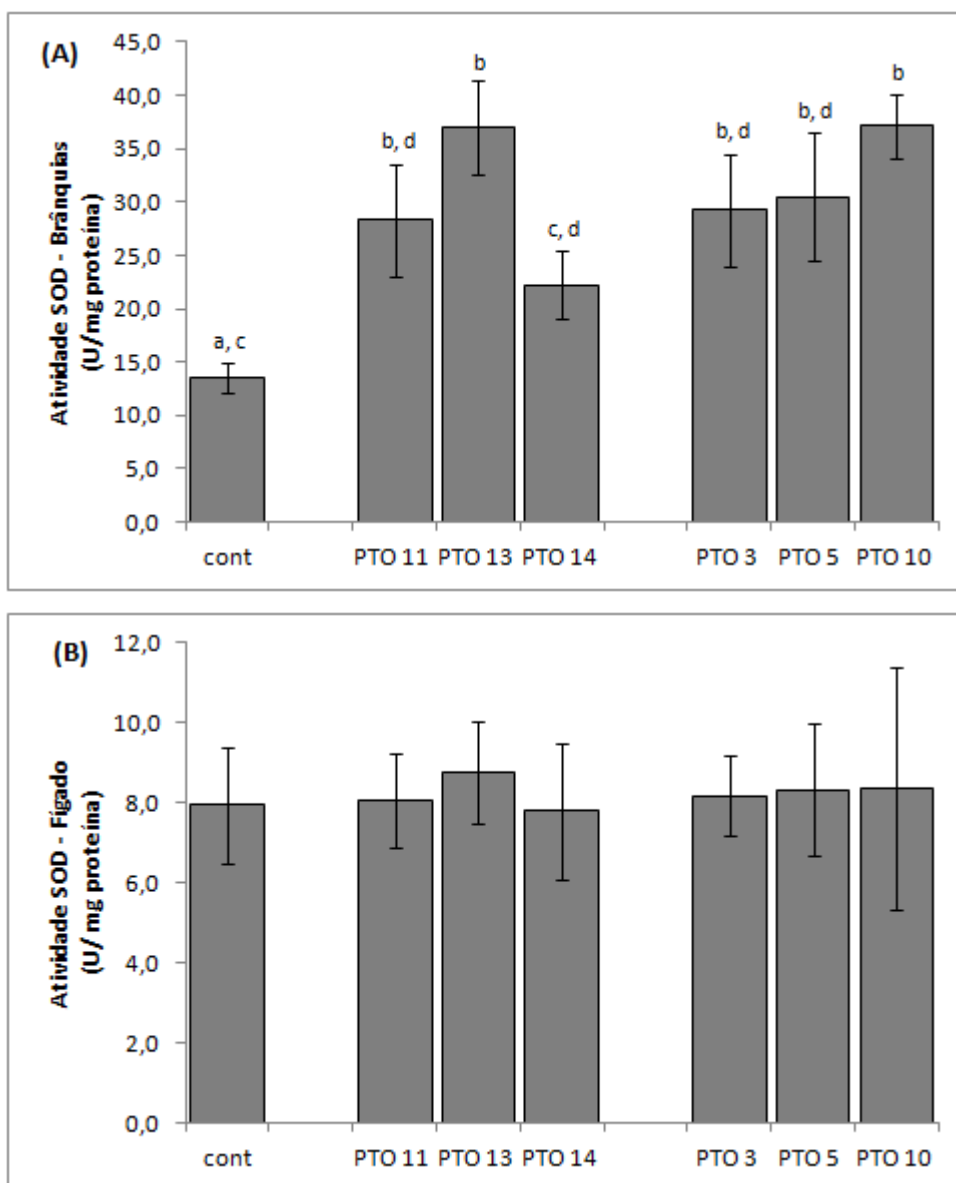
A GST, enzima de fase II da biotransformação, catalisa reações de conjugação de compostos tóxicos a ligantes endógenos a fim de facilitar a excreção (VAN DER OOST et al., 2003). Estudos mostram também que algumas isoformas da GST possuem atividade peroxidase e um aumento na atividade dessa enzima pode estar relacionado a uma defesa antioxidante do organismo (ALMEIDA et al., 2005). Desta

forma, o aumento na atividade da GST pode também indicar uma resposta dos peixes as EROs que foram geradas como consequência da intoxicação pelos compostos (SANCHES, 2014).

#### **4.2.3. Análise da SOD**

Nas brânquias, a atividade da SOD foi diferente em relação ao controle e entre os tratamentos (Figura IV. 8) exceto o P14 AQA que foi estatisticamente semelhante ao controle. Para este mesmo tecido, entre os tratamentos esta diferença foi observada entre os peixes expostos ao grupo que corresponde a montante da ETE AQA em relação à jusante. Além disso, também foi detectada diferença significativa entre às jusantes do lançamento de efluente tratado e não tratado, das cidades de Araraquara e Bauru, respectivamente.

O aumento na atividade enzimática da SOD revela que radicais superóxidos foram possivelmente gerados seja pelo metabolismo de detoxificação de fase I, aumento do metabolismo intermediário e consumo do oxigênio molecular, ou ainda devido a reações redox mediados por compostos como, por exemplo metais de transição, e combatidos por essa enzima como um mecanismo de defesa do organismo, prevenindo danos nas membranas (SANCHES, 2014). Dessa forma, fica claro que esta enzima possui um importante papel de proteção celular contra os radicais livres (ZHANG et al., 2004).



**Figura IV. 08.** Gráficos da atividade enzimática em média  $\pm$  desvio padrão da superóxido dismutase (SOD) em brânquias (A) e fígados (B) após a exposição de lambaris (*Astyanax sp.*) as amostras de água do Ribeirão das Cruzes (AQA) e Bauru (BAU). Letras iguais ou ausência de letras = diferença estatística insignificante. Letras diferentes = diferença estatística significativa.

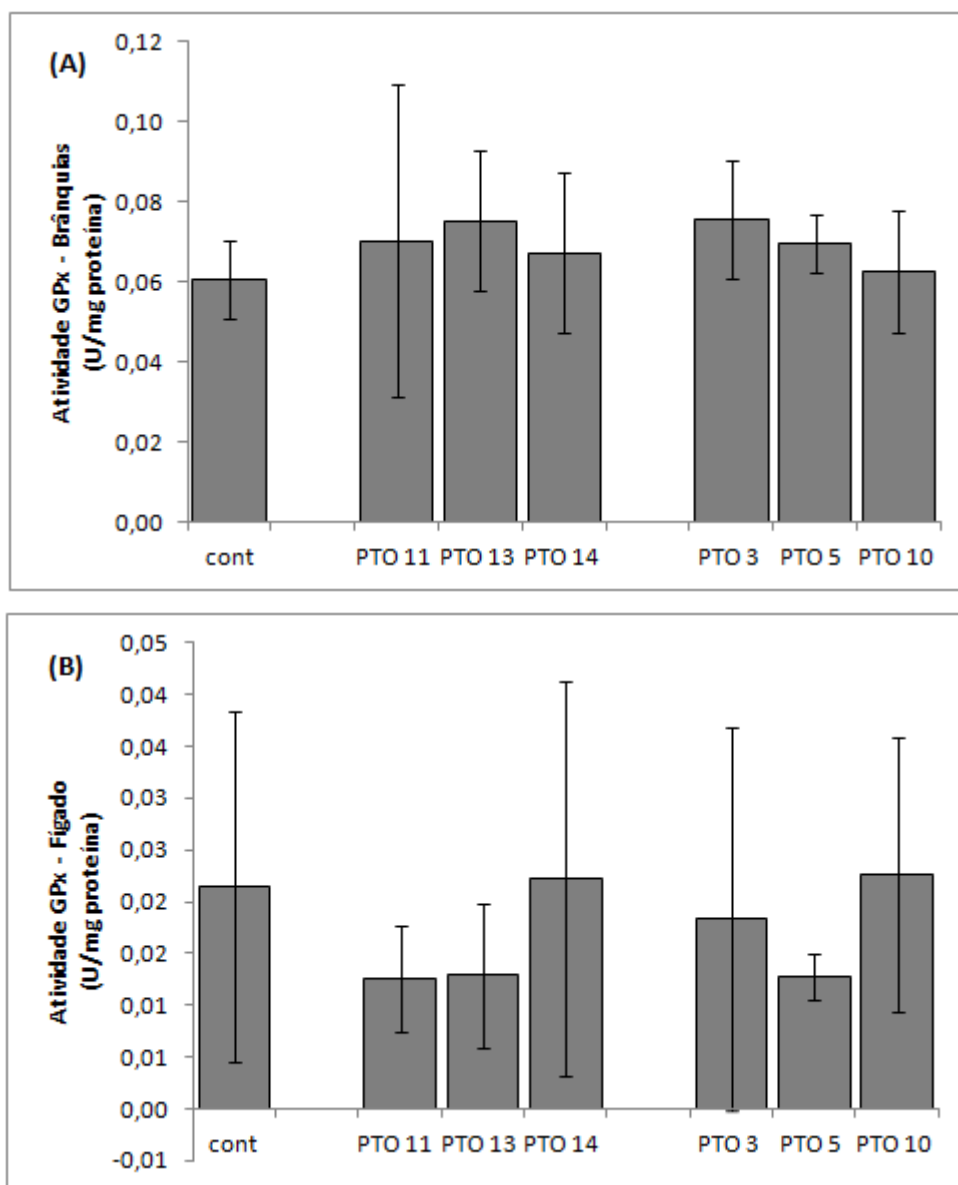
No fígado, não foi encontrada nenhuma variação entre os tratamentos e o grupo controle negativo e, portanto a atividade da SOD não foi significativamente diferente, o que pode ser verificado pela atividade enzimática semelhante nos organismos expostos às águas do Ribeirão das Cruzes e Rio Bauru, possivelmente contaminadas. Este fato pode ter ocorrido por diversos motivos, como por exemplo, o aporte dos contaminantes

possivelmente foi muito maior nas brânquias comparado ao fígado, o que justifica efeitos diferenciados entre os tecidos.

#### **4.2.4. Análise da GPx e CAT**

A atividade da enzima GPx em fígado e brânquias dos peixes expostos não foi afetada significativamente (Figura IV.9). Entretanto, quando se compara os tratamentos ao grupo controle, nota-se um leve aumento da atividade enzimática nos tecidos branquiais e a inibição nos tecidos hepáticos, principalmente dos peixes expostos ao grupo que corresponde a jusante do lançamento de efluente tratado e não tratado, das cidades de Araraquara e Bauru, respectivamente.

Segundo Almeida et al. (2005), muitas isoformas de GST desempenham a atividade da GPx. Como foram observadas diferenças significativas da atividade enzimática da GST em brânquias em relação ao grupo controle e entre os tratamentos, infere-se que esse fator poderia explicar a falta de indução na atividade da GPx neste tecido para essa espécie, caso tenha havido aumentos na produção de EROs.

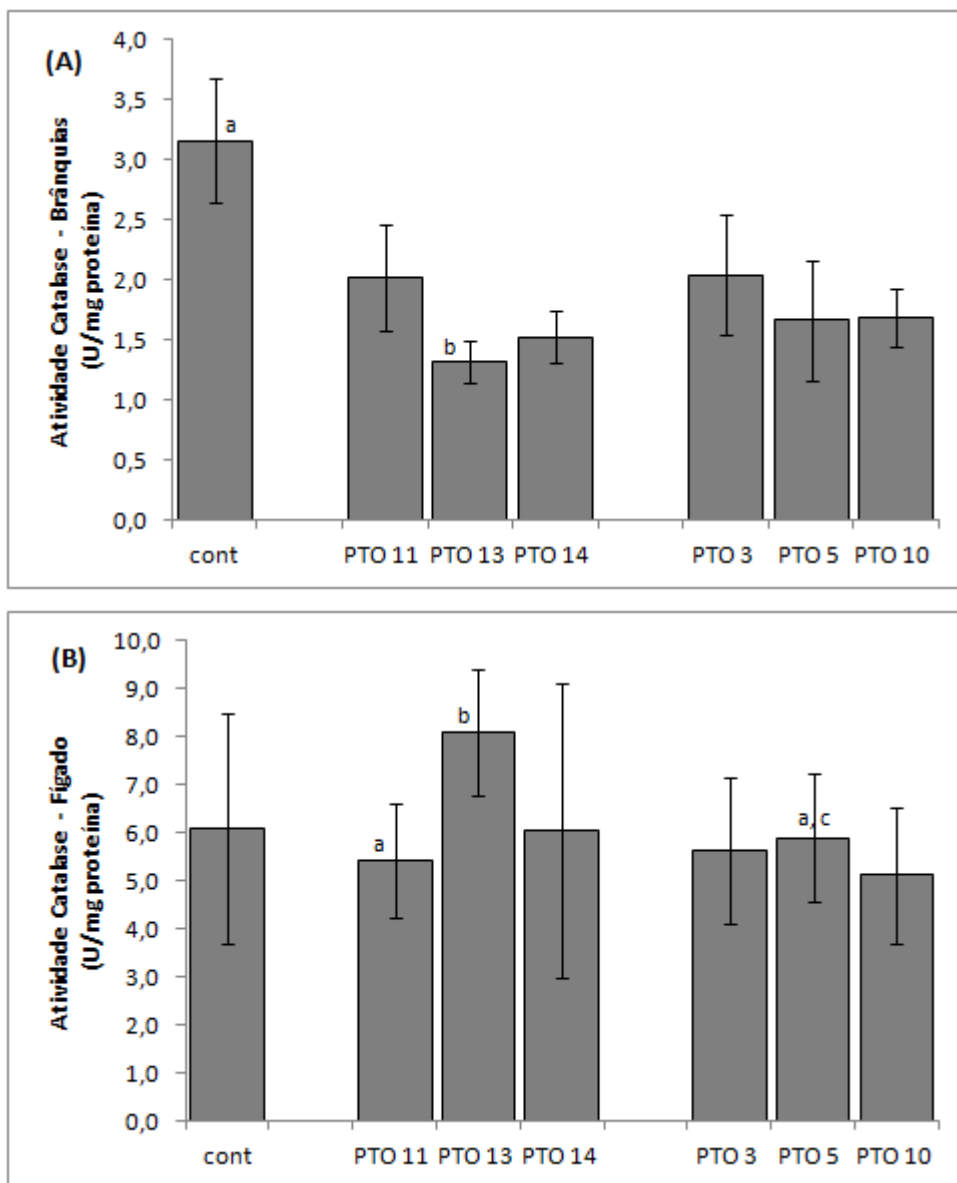


**Figura IV. 9.** Gráficos da atividade enzimática em média  $\pm$  desvio padrão da glutathiona peroxidase (GPx) em brânquias (A) e fígados (B) após a exposição de lambaris (*Astyanax sp.*) as amostras de água do Ribeirão das Cruzes (AQA) e Bauru (BAU). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os rios.

No tocante à catalase, a atividade enzimática em brânquias diminuiu significativamente em relação ao grupo controle negativo (Figura IV.10), que pode estar relacionada com a atividade da GST. Segundo Almeida e colaboradores (2005) o peróxido de hidrogênio gerado em algum momento durante o metabolismo, pode ter sido consumido pela ação antioxidante da GST fazendo com que a atividade da CAT

diminuísse significativamente. A alteração na atividade da CAT também pode ser resultado da inibição direta pela interação de metais com a enzima ou ainda, de maneira indireta pela inibição da síntese do heme, essencial para a estrutura proteica. Lukatkin e colaboradores (2014) avaliaram o efeito do cobre na atividade de enzimas antioxidantes, como a CAT. Os autores observaram que a atividade da CAT alcança um valor máximo quando a concentração do cobre é 10  $\mu\text{M}$ ; em concentrações elevadas de cobre, a atividade é diminuída.

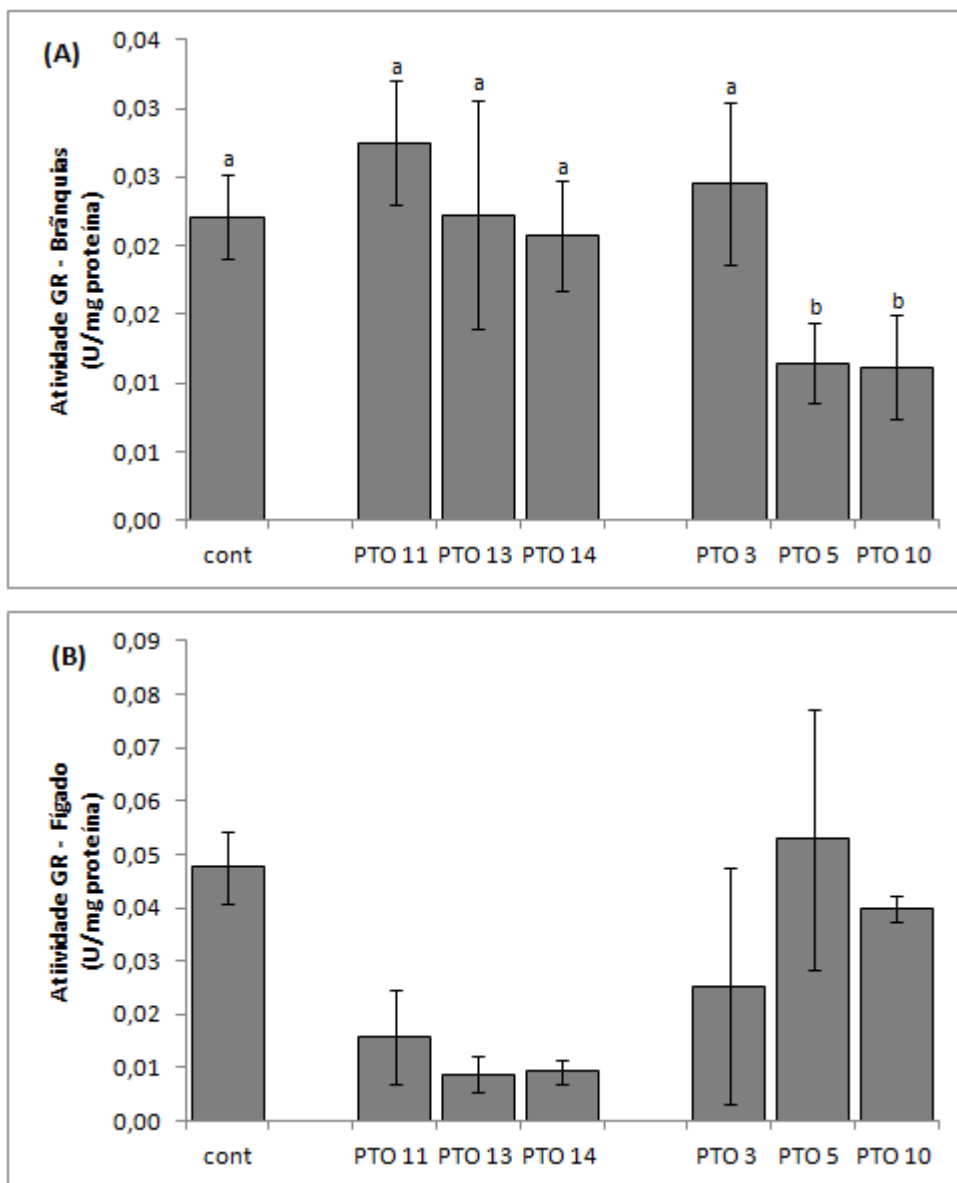
Em fígado observou-se um aumento da atividade enzimática apenas no P13 AQA e as diferenças estatísticas entre os tratamentos correspondentes aos pontos P11, P13 (AQA) e P5 (BAU) foram comprovadas pelo teste de Kruskal-Wallis, para dados não paramétricos. Segundo Simonato e colaboradores (2008), hidrocarbonetos derivados de petróleo, metais, inseticidas, fármacos e compostos estrogênicos são mediadores potentes na formação de EROs e o aumento da catalase em todos os tecidos examinados pode representar uma resposta adaptativa para proteger o organismo desse tipo de toxicidade.



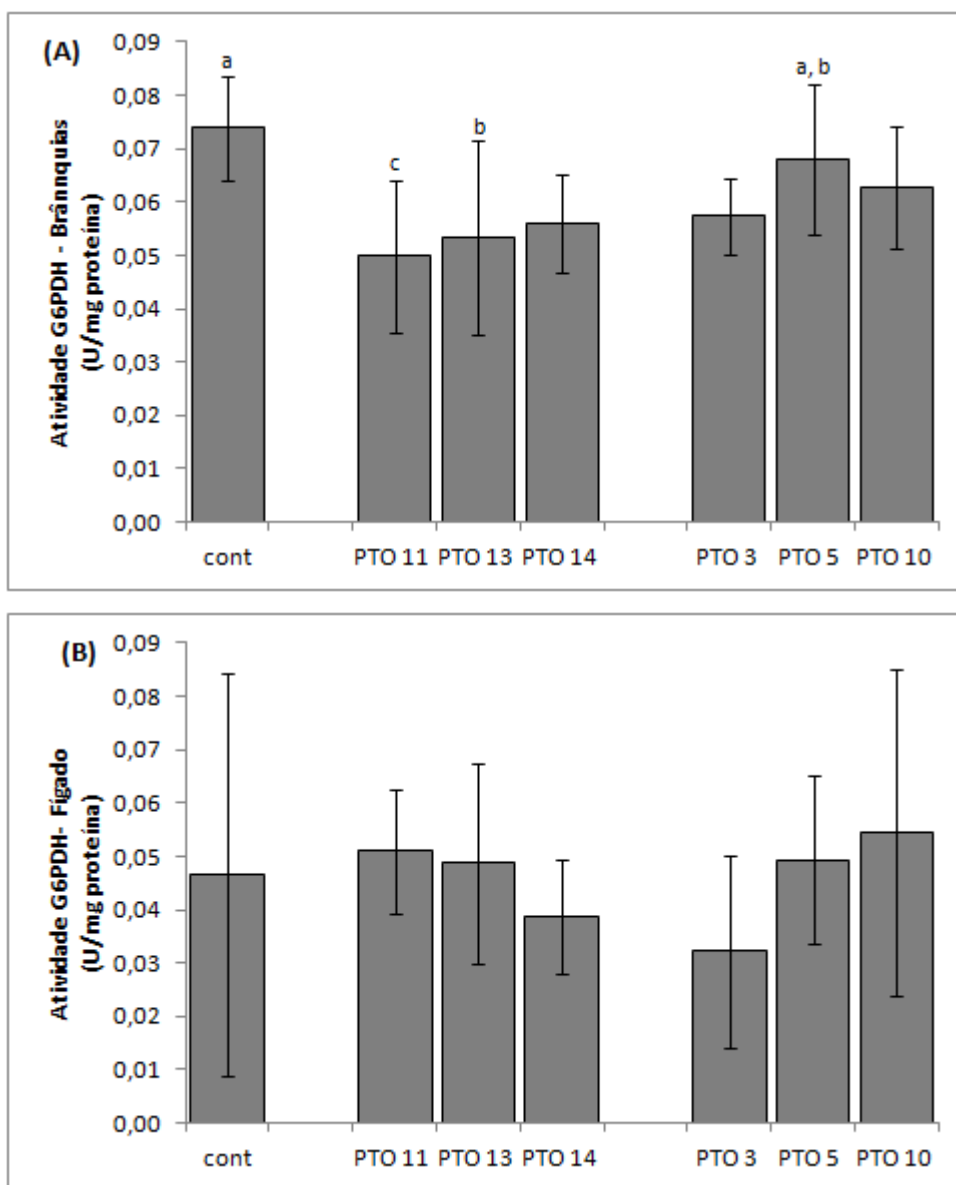
**Figura IV. 10.** Gráficos da atividade enzimática em média  $\pm$  desvio padrão da catalase (CAT) em brânquias (A) e fígados (B) após a exposição de lambaris (*Astyanax sp.*) as amostras de água do Ribeirão das Cruzes (AQA) e Bauru (BAU). Letras iguais ou ausência de letras = ausência de diferença estatística. Letras diferentes = diferença estatística significativa.

#### 4.2.5. Análise da GR e G6PDH

Com relação às enzimas antioxidantes complementares GR e G6PDH nos tecidos branquiais, observou-se um aumento na atividade da GR (Figura IV.11) nos animais expostos aos tratamentos (P11 AQA e P3 BAU) o que poderia ser uma tentativa de restabelecer os níveis de GSH a partir da GSSG gerada pela atividade da GPx. Para os tratamentos (P13 e P14) a atividade enzimática foi ligeiramente aumentada, porém sem diferenças significativas em relação ao controle. Por outro lado, a redução na atividade enzimática observada para os pontos onde a carga orgânica é elevada (P5 e P10) poderia indicar um prejuízo na homeostase GSH/GSSG, ainda que não tenha afetado as atividades da GPx e GST – pelo contrário, a GST foi maior nesses pontos. Ainda, a redução da GR possivelmente não se deveu à escassez de NADPH para sua atividade, visto que nesses pontos a atividade da G6PDH não foi igualmente diminuída (Figura IV.12).



**Figura IV. 11.** Gráficos da atividade enzimática em média  $\pm$  desvio padrão da glutathione redutase (GR) em brânquias (A) e fígados (B) após a exposição de lambaris (*Astyanax sp.*) as amostras de água do Ribeirão das Cruzes (AQA) e Bauru (BAU). Letras iguais ou ausência de letras = diferença estatística insignificante. Letras diferentes = diferença estatística significativa.



**Figura IV. 12.** Gráficos da atividade enzimática em média  $\pm$  desvio padrão da glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em brânquias (A) e fígados (B) após a exposição de lambaris (*Astyanax sp.*) as amostras de água do Ribeirão das Cruzes (AQA) e Bauru (BAU). Letras iguais ou ausência de letras = diferença estatística insignificante. Letras diferentes = diferença estatística significativa.

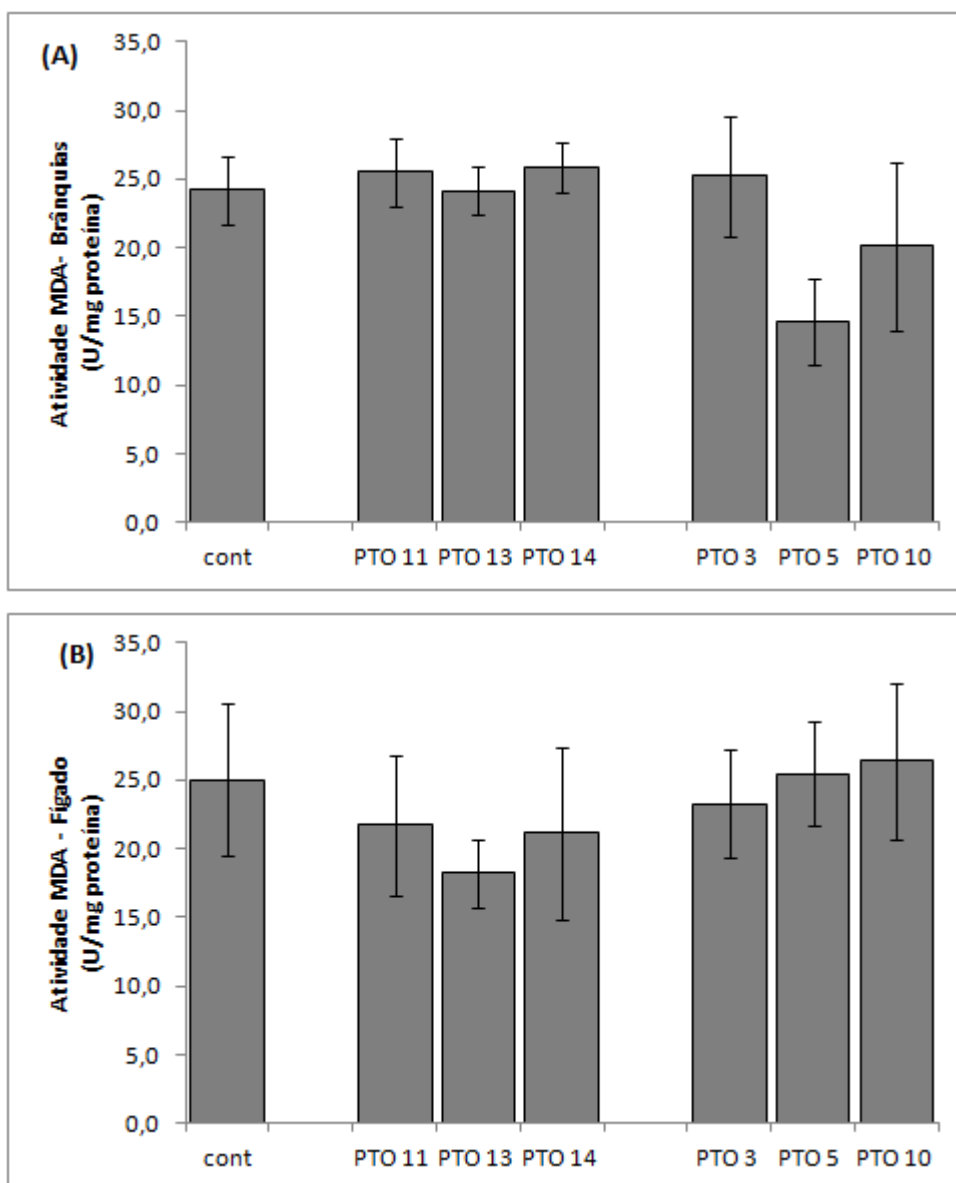
No fígado, a atividade enzimática da enzima GR (Figura IV.11 B) foi significativamente reduzida nos tratamentos contendo água do Ribeirão das Cruzes e do Rio Bauru em relação ao grupo controle negativo enquanto a G6PDH (Figura IV.12 B) permaneceu praticamente inalterada. Esse comportamento já era esperado e corrobora com a indução da enzima GPx, de forma que a homeostase GSH/GSSG é

mantida em nível que a atividade da GR e G6PDH não são alteradas, como observado em brânquias.

#### **4.2.6. Análise do MDA**

Em brânquias de lambaris não foi observado variação nos níveis de MDA após a exposição dos organismos teste às águas do Ribeirão das Cruzes (P11 e P14) bem como ao P3 do Rio Bauru. A exposição aos pontos de maior carga orgânica do Rio Bauru (P5 e P10) também não provocou alteração nos níveis de MDA em relação ao grupo controle negativo e entre os tratamentos (Figura IV.13).

Embora não medida, a atividade da EROD nos tecidos branquiais possivelmente foi aumentada gerando produtos de fase I a serem conjugados, o que está associado ao aumento na atividade da GST em brânquias observado principalmente nos grupos expostos a água do Rio Bauru onde a carga orgânica é maior (P5 e P10). Esse aumento revela que espécies reativas geradas no metabolismo de biotransformação de fase I foram combatidas pela ação antioxidante da GST fazendo com que a atividade da CAT diminuísse significativamente. Além disso, o peróxido de hidrogênio produzido pelo aumento da atividade da SOD foi combatido pela atividade da GPx. Dessa forma, o sistema de defesa antioxidante desses organismos foi capaz de combater eficientemente as ERO, possivelmente geradas no metabolismo de biotransformação de xenobióticos, evitando que ocorressem danos nas membranas dos organismos, o que foi observado pela não alteração nos níveis de MDA.



**Figura IV. 13.** Gráficos da atividade enzimática em média  $\pm$  desvio padrão do malondialdeído (MDA) em brânquias (A) e fígados (B) após a exposição de lambaris (*Astyanax sp.*) as amostras de água do Ribeirão das Cruzes (AQA) e Bauru (BAU). Letras iguais ou ausência de letras = diferença estatística insignificante. Letras diferentes = diferença estatística significativa.

Nos tecidos hepáticos dos organismos expostos ao P5 e P10 BAU, não foi observada atividade enzimática significativa para as enzimas de fase I e II e as de defesa antioxidantes, possivelmente porque o trabalho de detoxificação foi realizado majoritariamente pelos tecidos branquiais dos peixes. Dessa forma, não foi observada

ocorrência de peroxidação lipídica, uma vez que os níveis de MDA não variaram em relação ao controle.

#### **4.2.7. Análise estatística dos resultados**

Para interpretação dos dados através da PCA e correlação de Pearson, os dados foram arranjados relacionando os pontos de amostragem e o controle em função dos resultados obtidos para as enzimas (nas brânquias e no fígado) bem como das concentrações determinadas dos estrógenos, resultando numa matriz 7 x 19.

##### **4.2.7.1. Análise dos Componentes Principais**

A PCA foi utilizada principalmente para associar as atividades enzimáticas nos tecidos branquiais e hepáticos com as concentrações dos hormônios obtidas do ensaio químico para estes locais de amostragem, fornecendo uma visão geral do sistema.

As componentes principais geradas (CP1, CP2, CP3 e CP4) para as amostras de água explicaram 33,0%, 23,8%, 17,1% e 10,3% respectivamente, totalizando 84,3%. Para um sistema de correlação, como a PCA, considera-se que valores acima de 0,7 já são significativos, dessa forma este valor obtido é bastante expressivo tratando-se de sistemas biológicos.

Na análise da PCA, os pesos de cada variável foram calculados e são apresentados através de histogramas de loading e scores (Ver Apêndice F) e, com esses valores foram elaborados os gráficos biplots (Figura IV. 14) considerando ambos os resultados. A Figura a seguir demonstra os biplots relativos à CP1 – CP2 e CP1 - CP3.



Inicialmente, verifica-se que os dados apresentaram distribuição bastante distinta, com associações que podem ser realizadas para colaborar para o entendimento dos resultados obtidos.

A observação dos histogramas de loadings evidencia que na CP1 (33,0%) tem maior peso as variáveis GSTb, GSTf, GRf, G6b, G6f, MDAb, E2 e EE2 (sentido positivo); GRb, GPxb e MD Af (sentido negativo). Também há contribuição em menor proporção do estrógeno E1 no sentido positivo. Deles, é possível notar que as enzimas com maior peso (as indicadas, do sentido positivo) podem servir de biomarcadores para a presença dos estrógenos E2 e EE2, que foram quantificados principalmente nas amostras referentes aos pontos P5 e P10 do Rio Bauru, relacionados diretamente a atividade das enzimas no sentido positivo. Além disso, também é possível dizer que esses hormônios podem inibir a atividade das enzimas GRb e GPxb, que estão no sentido negativo da CP1. O hormônio E3 relaciona-se diretamente aos pontos P11, P13, P14 e P3, nos quais foram detectadas concentrações desse hormônio, pois ambos apresentam valor negativo na CP1.

Na CP2, as variáveis de maior peso são SODb, SODf, GPxb no sentido positivo, e Cb G6b no sentido negativo. O estrógeno que apresenta maior peso nesta componente é o E2 (sentido positivo). Dessa forma, infere-se que a atividade dessas enzimas pode estar associada as concentrações de E2 encontradas nas amostras de água. Em contraposição, a atividade enzimática é inibida para Cb e G6b. Outra informação relevante nessa componente é a relação entre a atividade da CATb que está fortemente associada ao grupo controle. Pode-se então atribuir um aumento na atividade aos tratamentos com baixa ou nenhuma concentração dos hormônios.

A CP 3 sofre influência principalmente atividades referente as enzimas ERODf, GPxf (sentido positivo), SODf e G6f (sentido negativo). Nesta componente principal ainda figuram os hormônios E1 e EE2 (sentido positivo). Fazendo correspondência ao gráfico de *scores* na mesma componente, observa-se maior destaque para o PTO 14, que possui a maior das concentrações ( $4,1 \text{ ng mL}^{-1}$ ) de E1 determinada, assim como a presença de EE2 ( $0,2 \text{ ng mL}^{-1}$ ). Dessa maneira, os respectivos resultados nas enzimas citadas pode ser indicativo destes hormônios.

#### 4.2.7.2. Análise de correlação

Objetivando estabelecer quais enzimas possuem maior ou menor correlação a determinado estrógeno bem como entre elas foi realizado análise de correlação de Pearson (Tabela IV.8) para melhorar o entendimento do sistema, cujos resultados são apresentados a seguir.

Para o estrógeno natural E1 não há correlações fortes com nenhuma das enzimas. Já observando o EE2 nota-se correlação positiva (0,81) com a atividade da GSTb, e correlação negativa (-0,75) com a atividade da GRb. Estes resultados dão indícios para um biomarcador, evidenciada na PCA, entretanto estes resultados são próximos aos obtidos ao hormônio E2 o que pode gerar confusão na interpretação dos resultados. A diferenciação entre um ou outro hormônio pode, então ser realizada utilizando a atividade da SODb e GSTf, previstos na observação da 1ª e da 2ª componente principal, cujas correlações são positivas e com valores aproximados de 0,65 sendo assim, a atividade enzimática da SODb e GSTf indicativo da presença de E2.

O hormônio E3 possui correlação negativa (-0,70) com a atividade da G6f. Esta condição inversamente proporcional pode ser confirmada quando observa-se a 3ª componente principal.

As demais correlações (positivas e negativas) podem ser utilizadas como informações complementares aos testes com os hormônios. As correlações relativas a CATb e CATf, por exemplo, relacionadas aos estrógenos evidenciam a condição demonstrada na PCA de que quanto maior a concentração menor a atividade enzimática.

**Tabela IV. 8.** Correlação de Pearson entre as enzimas de biotransformação, defesa antioxidante e os estrógenos.

	Cb	Cf	SODb	SODf	ERODf	GSTb	GSTf	GRb	GRf	G6b	G6f	GPxb	GPxf	MDAb	MDBf	E1	E2	E3	EE2	
<b>Cb</b>	<b>1,00</b>																			
<b>CF</b>	-0,29	<b>1,00</b>																		
<b>SODb</b>	<b>-0,78</b>	0,17	<b>1,00</b>																	
<b>SODf</b>	-0,51	0,57	<b>0,82</b>	<b>1,00</b>																
<b>ERODf</b>	-0,30	0,19	-0,15	-0,32	<b>1,00</b>															
<b>GSTb</b>	-0,49	-0,43	0,54	0,22	-0,13	<b>1,00</b>														
<b>GSTf</b>	0,18	-0,21	0,29	0,31	-0,54	0,11	<b>1,00</b>													
<b>GRb</b>	0,28	0,22	-0,35	-0,27	0,27	<b>-0,87</b>	-0,28	<b>1,00</b>												
<b>GRf</b>	0,49	-0,42	-0,20	-0,05	<b>-0,65</b>	0,42	0,29	<b>-0,63</b>	<b>1,00</b>											
<b>G6b</b>	<b>0,61</b>	-0,19	-0,47	-0,18	-0,36	0,19	0,16	-0,52	<b>0,89</b>	<b>1,00</b>										
<b>G6f</b>	-0,07	-0,01	0,33	0,39	<b>-0,70</b>	0,20	<b>0,78</b>	-0,43	0,30	0,14	<b>1,00</b>									
<b>GPxb</b>	-0,53	0,45	0,48	0,46	0,20	-0,10	-0,53	0,40	-0,55	<b>-0,66</b>	-0,43	<b>1,00</b>								
<b>GPxf</b>	0,32	-0,38	-0,39	-0,51	0,49	0,13	0,17	-0,21	0,15	0,38	-0,24	<b>-0,65</b>	<b>1,00</b>							
<b>MDAb</b>	0,20	0,17	-0,33	-0,35	0,58	<b>-0,76</b>	-0,14	<b>0,86</b>	<b>-0,73</b>	-0,52	-0,46	0,17	0,23	<b>1,00</b>						
<b>MDAf</b>	0,44	<b>-0,75</b>	-0,17	-0,26	-0,47	0,56	0,36	<b>-0,62</b>	<b>0,89</b>	<b>0,74</b>	0,22	<b>-0,64</b>	0,41	-0,59	<b>1,00</b>					
<b>E1</b>	-0,54	-0,34	0,10	-0,32	0,23	0,54	-0,28	-0,38	-0,11	-0,20	0,09	-0,10	0,03	-0,30	0,06	<b>1,00</b>				
<b>E2</b>	-0,41	-0,40	<b>0,65</b>	0,31	-0,09	<b>0,71</b>	<b>0,64</b>	<b>-0,61</b>	0,12	-0,08	0,44	-0,26	0,33	-0,31	0,38	0,24	<b>1,00</b>			
<b>E3</b>	0,05	-0,27	0,15	0,00	0,26	0,13	-0,26	0,20	-0,03	-0,13	<b>-0,70</b>	0,45	0,17	0,21	0,13	-0,34	0,08	<b>1,00</b>		
<b>EE2</b>	-0,54	-0,35	0,27	-0,10	0,24	<b>0,81</b>	0,00	<b>-0,75</b>	0,13	0,08	0,16	-0,31	0,37	-0,48	0,33	<b>0,82</b>	<b>0,61</b>	-0,21	<b>1,00</b>	

Critério utilizado: corr > 0,6 = média/alta; corr < -0,6 = média/alta

#### Considerações do Capítulo IV

As amostras de água coletadas no Ribeirão das Cruzes e Rio Bauru demonstram potencial estrogênico em estações distintas. Entretanto, no Ribeirão das Cruzes o potencial é mais evidente em Fevereiro, atribuído possivelmente à presença do E3 e outros compostos com potencial estrogênico. No Rio Bauru o potencial estrogênico foi maior em Setembro, provavelmente devido à presença do estrógeno natural E3 combinado ao sintético 17  $\alpha$ -Ethinilestradiol, considerado mais potente e mais estável em água em relação aos estrogênios naturais. No MPS, majoritariamente, os valores obtidos de EEQ foram baixos, o que significa uma menor ativação do gene repórter, portanto não há compostos com grande afinidade pelo receptor de estrógeno humano, sendo baixa a formação do complexo receptor-ligante.

Os lambaris mostraram-se bons organismos teste, pois foram responsivos a todos os tratamentos e biomarcadores testados. Além disso, a utilização dos mesmos é vantajosa por serem pequenos, fáceis de manusear e, facilmente adquiridos em pisciculturas e lojas de pesca, além de serem encontrados com grande frequência em ambientes naturais no Brasil. A exposição dos peixes aos tratamentos alteraram as enzimas de biotransformação e de defesa antioxidantes, principalmente nos tecidos branquiais, pois apesar do fígado ser o principal órgão de metabolização de xenobiótico, a brânquia é o primeiro órgão de contato com a água contaminada, absorvendo mais os compostos tóxicos. Além disso, por serem peixes da coluna d'água, espera-se que os tecidos branquiais sejam mais responsivos a contaminação. Portanto, infere-se que os compostos tóxicos possivelmente presentes na água do Ribeirão das Cruzes e Rio Bauru foram absorvidos pelo peixe, porém o mecanismo de defesa da espécie *Astyanax sp.* (lambaris) atuou de maneira eficiente para eliminar esses compostos sem causar danos mais severos ao organismo, como a peroxidação lipídica, comprovada pelos níveis de MDA que não sofreu aumento significativo.

## CONCLUSÕES GERAIS

Para avaliar a ocorrência de estrógenos naturais e sintéticos nos compartimentos aquáticos receptores de efluente inicialmente foram desenvolvidos e/ou otimizados métodos dentro dos parâmetros de confiabilidade analítica para extração desses compostos nas matrizes ambientais, água, sedimento e material particulado. Para água superficial o método SPE utilizou cartuchos poliméricos Strata-X em substituição aos convencionais C<sub>18</sub> (menos reprodutível) e HLB-Oasis (mais caro). Para MPS, comumente desprezado nas análises ambientais, utilizou-se extração sólido-líquido rápida e de baixo custo e, finalmente para sedimento o QuEChERS foi proposto como inovação para substituir métodos convencionais laboriosos utilizados na determinação de estrógenos em matrizes sólidas.

A distribuição desses compostos estrogênicos esteve associada à fase aquosa e particulada dos compartimentos ambientais analisados e a sazonalidade foi significativa somente para as amostras de água do Ribeirão das Cruzes. Neste mesmo rio, as concentrações encontradas em água superficial foram menores em relação ao Rio Bauru, em virtude, principalmente, de este último receber a carga orgânica total do município sem tratamento algum. Para o MPS desse mesmo rio, a concentração de estrógenos elevada e amplamente distribuída nos pontos amostrais, é resultado da adsorção a sólidos suspensos do efluente com elevado teor de matéria orgânica e não ao sedimento ressuspendido, uma vez que o mesmo possui característica arenosa, o que não favorece a adsorção. Isso demonstra a importância da inclusão do MPS em estudos de monitoramento ambiental, pois os organismos incorporam contaminantes também pela ingestão dessas partículas.

A toxicidade dos estrógenos sobre a biota aquática pode ser observada através de ensaios para avaliação da atividade estrogênica e uso de biomarcadores enzimáticos em brânquias e fígado de *Astyanax sp.* (lambaris). Os ambientes avaliados (Ribeirão das Cruzes e Rio Bauru) foram considerados estrogênicos e embora tenha sido observada presença dos estrógenos, estes não atuaram sozinhos para o potencial de etrogenicidade, pois não foi observada correlação diretamente significativa entre as concentrações obtidas e o valor de EEQ. Já a exposição dos lambaris a água do Rio Bauru e Ribeirão das Cruzes alterou as enzimas de biotransformação e defesa

antioxidantes, principalmente nos tecidos branquiais, indicando que os compostos tóxicos possivelmente presentes na água e MPS foram absorvidos pelo peixe, porém o mecanismo de defesa atuou de maneira eficiente para eliminar esses compostos sem causar danos mais severos ao organismo, como o estresse oxidativo.

Finalmente, pode-se presumir um possível impacto toxicológico a organismos aquáticos causado pelos estrógenos nas concentrações ambientalmente relevantes encontradas neste trabalho para água e MPS, embora os ensaios realizados não sejam totalmente específicos a esses compostos, o que significa dizer que os efeitos observados também podem estar associados à presença de outras substâncias tão quanto ou ainda mais tóxicas que os estrógenos naturais e sintético.

## REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em: <www.anvisa.gov.br.> Acesso em: 13 fev. 2013.
- AHRENS, L. et al. Distribution of polyfluoroalkyl compounds in water, suspended particulate matter and sediment from Tokyo Bay, Japan. **Chemosphere**, v. 79, p. 266-272, 2010.
- AKKANEN N. J.; TUIKKA, A.; KUKKONEN, J. V. K. On the borderline of dissolved and particulate organic matter: partitioning and bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 78, p. 91-98, 2012.
- ALMEIDA, E. A. et al. DNA damage in digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 135C, n. 3, p. 295-303, 2003.
- ALMEIDA, E. A. et al. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 318, p. 21-30, 2005.
- ALMEIDA, E. A. et al. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, n. 5, p. 386-92, 2004.
- AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira Epidemiologia**, v. 6, n. 2, p. 158-170, 2003.
- ANASTASSIADES, M. et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.
- ANDRADE, S. J. et al. Contribution of sugar-cane harvesting season to atmospheric contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Araraquara city, Southeast Brazil. **Atmospheric Environment**, v. 44, p. 2913-2919, 2010.
- ANDRÁSI, N. et al. Determination of steroids in the dissolved and in the suspended phases of wastewater and Danube River samples by gas chromatography, tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 115, p. 367-373, 2013.
- ARDITSOGLU, A.; VOUTSA, D. Occurrence and partitioning of endocrine-disruptors compounds in the marine environment of Thermaikos Gulf, Northern Aegean Sea, Greece. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, p. 2443-2452, 2012.
- AZCOITIA, I.; YAGUE, J. G.; GARCIA-SEGURA, L. M. Estradiol synthesis within the human brain. **Neuroscience**, 2011. Doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.02.012.
- AZZOUZ, A.; BALLESTEROS, E. Combined microwave-assisted extraction and continuous solid-phase extraction prior to gas chromatography–mass spectrometry determination of pharmaceuticals, personal care products and hormones in soils, sediments and sludge. **Science of the Total Environment**, v. 419, p. 208-215, 2012.

BAKER, V. A. Endocrine disrupters - testing strategies to assess human hazard. **Toxicology in Vitro**, v. 15, p. 413-419, 2001.

BARCELÓ, D. Emerging pollutants in water analysis. Editorial. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, p. xiv-xvi, 2003.

BARROS, E. C. de. (Org.). **Meio ambiente paulista**: relatório de qualidade ambiental 2003. São Paulo: SMA, 2013. 215 p.

BERTIN, A.; INOSTROZA, P. A.; QUIÑONES, R. A. Estrogen pollution in a highly productive ecosystem off central-south Chile. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, p. 1530-1537, 2011.

BEUTLER, E. **Red cell mMetabolism**: a manual of biochemical methods. New York: Grune & Stratton, 1975.

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

BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. **Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes**. Boca Raton; Lewis, 2003. 295 p.

BOLDRIN, P. K. et al. Estrogenic and mutagenic activities of *Crotalaria pallida* measured by recombinant yeast assay and Ames test. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 216-226, 2013.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 357 de 17 de Março de 2005 alterada pela Resolução 410/2009 e 430/2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2005. 27 p. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2012.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas**: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, v. 113, p. 129-146, 2003.

BRIX, R. et al. Analysis and occurrence of alkylphenolic compounds and estrogens in a European river basin and an evaluation of their importance as priority pollutants. **Analytical Bioanalytica Chemistry**, v. 396, p. 1301-1309, 2010.

BRONDI, S. H. G. et al. Evaluation of the QuEChERS method and gas chromatography– mass spectrometry for the analysis pesticide residues in water and sediment. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 86, p.18-22, 2011.

CANTARERO, S. et al. Matrix effect study in the determination of linear alkylbenzene sulfonates in sewage sludge samples. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 4, p. 813-818, 2011.

CARDOSO, M. H. W. M.; NOBREGA, A. W.; ABRANTES, S. Efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz: estudo de caso em tomates. **Revista Analytica**, v. 34, p. 48-55, 2008.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione-reductase. **Methods Enzymology**, v.113, p. 484-490, 1985.

CÉSPEDES, R. et al. Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia, NE Spain). **Chemosphere**, v. 61, n. 11, p. 1710-1719, 2005.

CÉSPEDES, R. et al. Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC–ESI-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, p. 697-708, 2004.

CHEN, W-L. et al. Ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of feminizing chemicals in river water, sediment and tissue pretreated using disk-type solid-phase extraction and matrix solid-phase dispersion. **Talanta**, v. 89, p. 237-245, 2012.

CIMINIELLO, P. et al. Palytoxin in seafood by liquid chromatography tandem mass spectrometry: investigation of extraction efficiency and matrix effect. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 3, p. 1043-1050, 2011.

COMBALBERT, S.; HERNANDEZ-RAQUET, G. Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 86, p. 1671-1692, 2010.

COMITÊ DE BACIA HIDROGRÁFICA DO TIETÊ-JACARÉ. **Relatório de situação dos recursos hídricos na Bacia Hidrográfica Tietê-Jacaré**. 2009. 29 p. Disponível em: <<http://www.sigrh.sp.gov.br/sigrh/ARQS/RELATORIO/CRH/CBH-TJ/1323/relatorio%20de%20situacao%202009.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2011.

COMITÊ DE BACIA HIDROGRÁFICA DO TIETÊ-JACARÉ. **Relatório de situação dos recursos hídricos 2013 – Ano base 2012**. 2013. 114 p. Disponível em: <<http://www.sigrh.sp.gov.br/sigrh/ARQS/RELATORIO/CRH/CBH-AT/1744/rel%20sit%20at%202013%20ano%20base%202012.pdf>>. Acesso em: 17 nov. 2013.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Directive 2002/657/EC. **Official Journal of the European Communities**, p. L221/8-L221/36, 2002.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Relatório de qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo**. 2009. São Paulo, 2010. 310 p. Série Relatórios/CETESB. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/tecnologia-ambiental/laboratorios/61-publicacoes-e-relatorios---relatorios-de-qualidade>>. Acesso em: 09 jun. 2012.

CONSELHO DA UNIÃO EUROPÉIA. Diretiva 2013/39/UE. Altera as Diretivas 2000/60/CE e 2008/105/CE no que respeita às substâncias prioritárias no domínio da política da água. **Jornal Oficial da União Européia**, 2013. Disponível em: <[eur-lex.europa.eu/legal-content/PP/TXT/?uri=uriserv:OJ.L\\_.2013.226.01.0001.01.POR](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PP/TXT/?uri=uriserv:OJ.L_.2013.226.01.0001.01.POR)>. Acesso em: 13 fev. 2013.

CONSTANTINI, D. Redox physiology in animal function: the struggle of living in an oxidant environment. **Current Zoology**, v. 56, p. 687-702, 2010.

D'ASCENZO, G. et al. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. **The Science of the Total Environment**, v. 302, p. 199-209, 2003.

DIRTU, A. C. et al. Analytical methods for selected emerging contaminants in human matrices-a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, n. 9, p. 2555-2581, 2012.

DROŹDŹYŃSKI, D.; KOWALSKA, J. Rapid analysis of organic farming insecticides in soil and produce using ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 394, p. 2241-2247, 2009.

DUONG, C. N. et al. Estrogenic chemicals and estrogenicity in river waters of South Korea and seven Asian countries. **Chemosphere**, v. 78, p. 286-293, 2010a.

DUONG, C. N. et al. Sorption of estrogens onto different fractions of sediment and its effect on vitellogenin expression in Male Japanese Medaka. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 59, p.147-156, 2010b.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee**. EDSTAC's Final Report, 1998. Disponível em: <<http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/edspoverview/finalrpt.htm>>. Acesso em: 10 nov. 2013.

ERGER, C. et al. Multi-component trace analysis of organic xenobiotics in surface water containing suspended particular matter by solid phase extraction/gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1249, p. 181-189, 2012.

ESTEBAN, S. et al. Analysis and occurrence of endocrine-disrupting compounds and estrogenic activity in the surface waters of Central Spain. **Science of the Total Environment**, v. 466/467, p. 939-951, 2014.

EURACHEM WORKING GROUP. **The fitness for purpose of analytical methods**. London, 1998. p. 75. (Eurachem Guide). Disponível em: <[http://www.eurolab-d.bam.de/eurachem\\_dokumente/The%20Fitness%20for%20Purpose%20of%20Analytical%20Methods%20A%20Laboratory%20Guide%20to%20Method%20Validation%20and%20Related%20Topics%20\(1998\).pdf](http://www.eurolab-d.bam.de/eurachem_dokumente/The%20Fitness%20for%20Purpose%20of%20Analytical%20Methods%20A%20Laboratory%20Guide%20to%20Method%20Validation%20and%20Related%20Topics%20(1998).pdf)>. Acesso em: 25 jun. 2012.

EUROPEAN PARLIAMENT AND COUNCIL. Directive 2000/60/EC. Establishing a framework for community action in the field of water policy. **Official Journal of the European Communities**, 2000. Disponível em: <[eic.europa.eu/environment/water/water-framework/index\\_en.html](http://eic.europa.eu/environment/water/water-framework/index_en.html)>. Acesso em: 13 fev. 2013.

FAN, S. et al. Simultaneous determination of 13 phytohormones in oilseed rape tissues by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry and the evaluation of the matrix effect. **Journal of Separation Science**, v. 34, p. 640-650, 2011.

FANG, H. et al. Quantitative comparisons of *in vitro* assays for estrogenic activities. **Environmental Health Perspect**, v. 108, p. 723-729, 2000.

FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutation Research**, v. 475, p. 89-111, 2001.

FERNANDEZ, M. P. et al. Toxicity identification fractionation of environmental estrogens in waste water and sludge using gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry and recombinant yeast assay. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, p. 957-968, 2009.

FERREIRA, M. G. M. **Remoção da atividade estrogênica de 17 $\beta$ -estradiol e de 17 $\alpha$ -etinilestradiol pelos processos de ozonização e O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**. 2008. 192 f. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

FONTENELE, E. G. P. et al. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 54, n. 1, p. 6-16, 2010.

FROEHNER, S. et al. Occurrence of selected estrogens in mangrove sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, p. 75-79, 2012.

FROEHNER, S. et al. Occurrence of sexual hormones in sediments of mangrove in Brazil. **Water Air Soil Pollut**, v. 219, p. 591-599, 2011.

GABET, V. et al. Analysis of estrogens in environmental matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1113-1131, 2007.

GARCIA-REYERO, N. et al. Estrogenic activity in sediments from European mountain lakes. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 6, p. 1427-1435, 2005.

GARCIA-REYERO, N. et al. Estrogenic potential of halogenated derivatives of nonylphenol ethoxylates and carboxylates. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 3, p. 705-711, 2004.

GARCÍA-REYERO, N. et al. Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, p. 1152-1158, 2001.

GAVRILESCU, M. et al. Emerging pollutants in environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. **New Biotechnology**, 2014. In press.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 695-706, 2007.

GLOCK, G. E.; McLEAN, P. Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **Biochemical Journal**, v. 55, p. 400-408, 1953.

GONG, J. et al. Association of endocrine-disrupting chemicals with total organic carbon in riverine water and suspended particulate matter from the Pearl River, China. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 11, p. 2456-2464, 2012.

GONG, J. et al. Occurrence of endocrine-disrupting chemicals in riverine sediments from the Pearl River Delta, China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 63, n. 5/12, p. 556-563, 2011.

GONG, J. et al. Occurrence and environmental risk of endocrine-disrupting chemicals in surface waters of the Pearl River, South China. **Environmental Monitoring Assessment**, v. 156, p. 199-210, 2009.

GONZÁLEZ, S.; LÓPEZ-ROLDÁN, R.; CORTINA, R-L. Presence and biological effects of emerging contaminants in Llobregat River basin: a review. **Environmental Pollution**, v. 161, p. 83-92, 2012.

GRAUMANN, K.; BREITHOFER, A.; JUNGBAUER, A. Monitoring of estrogen mimics by a recombinant yeast assay: synergy between natural and synthetic compounds? **Science of The Total Environment**, v. 225, n. 1/2, p. 69-79, 1999.

GRAY, L. E. Jr. et al. Endocrine screening methods Workshop Report: detection of estrogenic and androgenic hormonal and antihormonal activity for chemicals that act via receptor or steroidogenic enzyme mechanisms. **Reproductive Toxicology**, v. 11, n. 5, p. 719-750, 1997.

GRUBER, C. J. et al. Production and actions of estrogens. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 5, p. 340-352, 2002.

GRUND, S. et al. The endocrine disrupting potential of sediments from the Upper Danube River (Germany) as revealed by *in vitro* bioassays and chemical analysis. **Environmental Science Pollution Research**, v. 18, n. 3, p. 446-460, 2011.

GUNATILAKE, S. R.; CRAVER, S.; KWON, J-W. Analysis of estrogens in wastewater using solid-phase extraction, QuEChERS cleanup, and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 96, p. 1440-1447, 2014.

HIBBERD, A. et al. An improved method for the simultaneous analysis of phenolic and steroidal estrogens in water and sediment. **Talanta**, v. 77, p. 1315-1321, 2009.

HUANG, B. et al. Occurrence, removal and bioaccumulation of steroid estrogens in Dianchi Lake catchment, China. **Environment International**, v. 59, p. 262-273, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo 2010**. Disponível em: <[http://www.censo2010.ibge.gov.br/primeiros\\_dados\\_divulgados](http://www.censo2010.ibge.gov.br/primeiros_dados_divulgados)>. Acesso em: 05 maio 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Brasília, DF, 2010. 35 p.

JARDIM, W. F. et al. An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water. **Separation and Purification Technology**, v. 84, p. 3-8, 2012.

JAROSOVÁ, B. et al. What level of estrogenic activity determined by *in vitro* assays in municipal waste waters can be considered as safe? **Environment International**, v. 64, p. 98-109, 2014.

JIANG, W. et al. Assessment of source water contamination by estrogenic disrupting compounds in China. **Journal of Environmental Sciences**, v. 24, n. 2, p. 320-328, 2012.

KAMATA, R. et al. Estrogenic effects of leachates from industrial waste landfills measured by a recombinant yeast assay and transcriptional analysis in Japanese medaka. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 2, p. 430-437, 2011.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **Journal Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183-6188, 1976.

KIM, S. et al. *In vitro* and *in vivo* toxicities of sediment and surface water in an area near a major steel industry of Korea: endocrine disruption, reproduction, or survival effects combined with industrial analysis. **Science of the Total Environment**, v. 470/471, p. 1509-1516, 2014.

KOZLIK, P. et al. Development of a solid-phase extraction with capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of estrogens in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 2127-2132, 2011.

KVICALOVA, M. et al. Application of different extraction methods for the determination of selected pesticide residues in sediments. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 89, p. 21-26, 2012.

LaFLEUR, A. D.; SCHUG, K. A. A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous systems. **Analytica Chimica Acta**, v. 696, p. 6-26, 2011.

LANÇAS, F. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004.

LENNQUIST, A.; CLANDER, M. C.; FÖRLIN, L. Effects of medetomidine on hepatic EROD activity in three species of fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, p. 74-79, 2008.

LI, J. et al. Spatial and seasonal variations of occurrences and concentrations of endocrine disruptors chemicals in unconfined and confined aquifers recharged by reclaimed water: a field study along the Chaobai River, Beijing. **Science of the Total Environment**, v. 450/451, p. 162-168, 2013.

LIMA, D. **Estudo do efeito de metais em esterases de zebrafish (Danio rerio)**. 2011. 51 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2011.

LIMA, L. D. D. et al. Low cost methodology for estrogens monitoring in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC with fluorescence detection. **Talanta**, v. 115, p. 980-985, 2013.

LOPES, L. G. et al. Estrogênios em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal – São Paulo. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 639-643, 2010.

LUCCI, P.; NÚÑEZ, O.; GALCERAN, M. T. Solid-phase extraction using molecularly imprinted polymer for selective extraction of natural and synthetic estrogens from aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 30, p. 4828-4833, 2011.

LUKATKIN, A. et al. Effect of copper on pro- and antioxidative reactions in radish (*Raphanus sativus L.*) *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 28, p. 80-86, 2014.

LUO, J. et al. Identification of estrogen receptor agonists in sediments from Wenyu River, Beijing, China. **Water Research**, v. 45, p. 3908-3914, 2011.

MACEDO, M. F. **Avaliação do sistema de monitoramento de recursos hídricos e da viabilidade técnica, legal e econômica da aplicação da resolução conama 357/2005 para a sub-bacia do Ribeirão das Cruzes (Araraquara-SP)**. 2007. 110 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) – Programa de Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Centro Universitário de Araraquara, Araraquara, 2007.

MACHADO, C. G. Caracterização química dos agregados e sedimentos superficiais na zona de máxima turbidez no complexo estuarino de Paranaguá (CEP). **Boletim Paranaense de Geociências**, v. 64/64, p. 40-47, 2011.

MANSILHA, C. et al. Quantification of endocrine disruptors and pesticides in water by gas chromatography–tandem mass spectrometry. Method validation using weighted linear regression schemes. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 6681-6691, 2010.

MARFIL-VEGA, R.; SUIDAN, M. T.; MILLS, M. A. Abiotic transformation of estrogens in synthetic municipal wastewater: an alternative for treatment? **Environmental Pollution**, v. 158, p. 3372-3377, 2010.

MARQUES, M. A. S.; PEREIRA, H. M. G.; AQUINO NETO, F. R. Controle de dopagem de anabolizantes: o perfil esteroidal e suas regulações. **Revista Brasileira de Medicina e Esporte**, v. 9, n. 1, p. 15-24, 2003.

MARTÍN, J. et al. Multi-residue method for the analysis of pharmaceutical compounds in sewage sludge, compost and sediments by sonication-assisted extraction and LC determination. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 1760-1766, 2010.

MASCHIO, L. R. **Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e Mutagênico das águas do Rio Preto na área de influência da região de São José do Rio Preto/SP**. 2009. 208 f. Tese (Doutorado em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2009.

MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 1040, p. 259-272, 2004.

MOURA, J. A. **Estudo da eficiência de Estações de Tratamento de Esgoto - ETE e Estações de Tratamento de Água – ETA na eliminação de resíduos de estrógenos naturais e sintéticos na UGRHI-13 (Tietê-Jacaré)**. 2009. 188 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

NAKAMURA, S.; SIAN, T. H.; DAISHIMA, S. Determination of estrogens in river water by gas chromatography - negative - ion chemical - ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 919, p. 275-282, 2001.

NIE, M. et al. Environmental estrogens in a drinking water reservoir area in Shanghai: occurrence, colloidal contribution and risk assessment. **Science of the Total Environment**, 2013. In press.

- NOGUEIRA, L. **Estudo comparativo do estresse oxidativo entre tilápias (*Oreochromis niloticus*) e cascudos (*Pterygoplichthys anisitsi*) expostos a óleo diesel**. 2008. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2008.
- NOGUEROL, T-N. et al. Detection of hormone receptor ligands in yeast fluorogenic methods. **Talanta**, v. 69, p. 351-358, 2006.
- NORDBERG, J.; ARNER, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.
- NORLI, H. R.; CHRISTIANSEN, A.; DERIBE, E. Application of QuEChERS method for extraction of selected persistent organic pollutants in fish tissue and analysis by gas chromatography mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7234-7241, 2011.
- OLIVEIRA, C. R. **Determinação de biomarcadores e compostos organoestênicos em amostras de sedimentos superficiais de três regiões portuárias do estado de Santa Catarina, Brasil**. 2010. 156 f. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.
- PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, n. 1, p. 64-75, 2001.
- PAL, A. et al. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 6062-6069, 2010.
- PASSOS, A. L. S. et al. A yeast assay based on the gilthead sea bream (teleost fish) estrogen receptor  $\beta$  for monitoring estrogens mimics. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1529-1537, 2009.
- PINHO, G. et al. Efeito matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 987-995, 2009.
- POJANA, G. et al. Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. **Environment International**, v. 33, p. 929-936, 2007.
- POUECH, C. et al. Multi-residue analysis of free and conjugated hormones and endocrine disruptors in rat testis by QuEChERS-based extraction and LC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, p. 2777-2788, 2012.
- PRESTES, O. D. et al. QuEChERS – um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, n. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.
- RAIMUNDO, C. C. M. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais a bacia do Rio Atibaia**. 2007. 108 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

RAMSDORF, W. **Avaliação da toxicidade dos compostos fipronil, nitrato de chumbo e naftaleno em peixes**. 2011. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

RAO, K. et al. Determination of estrogens and estrogenic activities in water from three rivers in Tianjin, China. **Journal of Environmental Sciences**, v. 25, n. 6, p. 1164-1171, 2013.

REIS FILHO, R.; ARAÚJO, J. C.; VIEIRA, E. M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 817-822, 2006.

RESENDE, F. A. **Estudo do potencial antimutagênico, mutagênico, estrogênico e antibacteriano de flavonoides**. 2011. 183 f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBECCO, C. et al. Teleost fish (*Solea solea*): a novel model for ecotoxicological assay of contaminated sediments. **Aquatic Toxicology**, v. 109, p. 133-142, 2012.

RIBEIRO, F. A. L. et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

RICHARDSON, S. D.; TERNES, T. A. Water analysis: emerging contaminants and current issues. **Analytical Chemistry**, v. 83, p. 4614-4648, 2011.

ROBINSON, B. J. et al. Estrogenic compounds in seawater and sediment from halifax harbour, Nova Scotia, Canada. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 18-25, 2009.

ROCHA, M. J. et al. Determination of seventeen endocrine disruptor compounds and their spatial and seasonal distribution in Ria Formosa Lagoon (Portugal). **Environmental Monitoring Assessment**, v. 185, p. 8215-8226, 2013.

SALVIA, M-V. et al. Development of a multi-residue method using acetonitrile-based extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of steroids and veterinary and human drugs at trace levels in soil. **Journal of Chromatography A**, v. 1245, p. 122-133, 2012.

SANCHES, A. L. M. **Avaliação dos efeitos deletérios do diuron e de seus metabólitos em lambaris (*Astyanax sp.*): testes de toxicidade, marcadores de estresse oxidativo, marcadores genotóxicos e enzimas de biotransformação**. 2013. 81 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2014.

SANCHEZ, D. C. O. **Desreguladores endócrinos na indução da vitelogenina em peixes nativos**. 2006. 71 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SÁNCHEZ-ANDRADE, G.; KENDRICK, K. M. Roles of  $\alpha$ - and  $\beta$ -estrogen receptors in mouse social recognition memory: effects of gender and the estrous cycle. **Hormones and Behavior**, v. 59, p. 114-122, 2011.

SANTOS, D. M. **Compostos butílicos de estanho em tecidos de bagres estuarinos (Siluriformes, Ariidae) da costa sul e sudeste brasileira**: monitoramento e toxicidade. 2012. 249 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SÃO PAULO (Estado). Defesa Civil do Estado de São Paulo. **Informações de precipitação pluviométrica**. Disponível em: <[www.defesacivil.sp.gov.br/v2010/portal\\_defesacivil/conteudo/meteorologia.asp](http://www.defesacivil.sp.gov.br/v2010/portal_defesacivil/conteudo/meteorologia.asp)>. Acesso em: 25 mar. 2014.

SCHÄFER, A. I.; AKANYETI, I.; SEMIÃO, A. J. C. Micropollutant sorption to membrane polymers: a review of mechanisms for estrogens. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 164, p. 100-117, 2011.

SENGUPTA, A. et al. The occurrence and fate of chemicals of emerging concern in coastal urban rivers receiving discharge of treated municipal wastewater effluent. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 2, p. 350-358, 2014.

SEWALD, A. M. et al. Caracterização química do extrato orgânico de sedimentos em áreas de cultivo de ostras e mexilhões na Baía Sul de Florianópolis, SC. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 4, p. 413-433, 2012.

SIES, H. et al. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Letters**, v. 103, n. 2, p. 287-290, 1979.

SILVA, A. G. **Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores da contaminação aquática**. 2004. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências Biológicas, Zoologia e Botânica, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

SILVA, C.A. **Avaliação da qualidade da água após cinco anos de derramamento de petróleo no município de Araucária, Paraná**. 2007. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SILVA, C. G. A. da; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.

SILVA, F. S. et al. PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub>: the influence of sugarcane burning on potential cancer risk. **Atmospheric Environment**, v. 44, p. 5133-5138, 2010.

SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, n. 1, p. 112-20, 2008.

SODRÉ, F. F. et al. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 92-98, 2010.

SOLÉ, M. et al. Hepatic biomarkers of xenobiotic metabolism in eighteen marine fish from NW Mediterranean shelf and slope waters in relation to some of their biological and ecological variables. **Marine Environmental Research**, v.70, p.181-188, 2010.

SOLE, M.; PORTE, C.; BARCELO, D. Vitellogenin induction and other biochemical responses in carp, *Cyprinus carpio*, after experimental injection with 17 alpha-ethynylestradiol. **Archives Environmental Contamination and Toxicology**, v. 38, p. 494-500, 2000.

STEWART, M. et al. A survey of emerging contaminants in the estuarine receiving environment around Auckland, New Zealand. **Science of the Total Environment**, v. 468/469, p. 202-210, 2014.

STRECK, G. Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 635-652, 2009.

STRICKLAND, J. D. H.; PARSONS, T. R. **A practical handbook of seawater analysis**. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada, 1972. p. 328.

STUART, M. et al. Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. **Science of the Total Environment**, v. 416, p. 1-21, 2012.

SUGUIO, K. **Introdução à sedimentologia**. São Paulo: Edgard Blücher, 1973.

SUN, K. et al. Sorption of endocrine disrupting chemicals by condensed organic matter in soils and sediments. **Chemosphere**, v. 80, p. 709-715, 2010.

SURI, R. P. S. et al. Ultrasound assisted destruction of estrogens in aqueous solution: effect of power density, power intensity and reactor configuration. **Journal of Hazardous Materials**, v. 146, p. 472-478, 2007.

SWAN, S. H. et al. Semen quality of fertile US males in relation to their mothers' beef consumption during pregnancy. **Human Reproduction**, v. 22, n. 6, p. 1497-1502, 2007.

TADEO, J. L. et al. Analysis of emerging organic contaminants in environmental solid samples. **Central European Journal of Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 480-520, 2012.

TAIEB, J.; LACHGAR-KELTOUM, M. L'estradiol: caractéristiques immunoanalytiques. **Immuno-analyse en Biologie Spécialisée**, v. 26, n. 280/286, p. 280-286, 2011.

TAPIERO H.; NGUYEN-BA, G.; TEW, K. D. Estrogens and environmental estrogens. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, p. 36-44, 2002.

TEODORO, V. L. I. **Caracterização ambiental, socioeconômica e da percepção da população de uma microbacia hidrográfica urbana**: córrego Marivan, Araraquara, SP. 2008. 164 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) - Programa de Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Centro Universitário de Araraquara, Araraquara, 2008.

TERNES, T. A. et al. Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 3498-3504, 2002.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v.74, n. 5, p. 835-855, 2002.

THOMPSON, M. et al. Harmonised guidelines for the use of recovery information in analytical measurement (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, n. 2, p. 337-348, 1999.

TREVISAN, R. **Marcadores de estresse oxidativo e outros parâmetros biológicos em peixes e bivalves como ferramentas de monitoramento ambiental**: análise de dois ecossistemas catarinenses. 2008. 70 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. A.; RIEDO, C. R. **Análise quantitativa por cromatografia**. Disponível em: <<http://www.chemkeys.com/artigo/12/0>>. Acesso em: 10 jul. 2012.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VANPARYS, C. et al. Performance of the flow cytometric E-screen assay in screening estrogenicity of pure compounds and environmental samples. **Science Total Environmental**, v. 408, n. 20, p. 4451-4460, 2010.

WANDA, G. J. et al. Estrogenic properties of isoflavones derived from *Millettia griffoniana*. **Phytomed**, v. 13, n. 3, p. 139-145, 2006.

WANG, H-X.; ZHOU, Y.; JIANG, Q-W. Simultaneous screening of estrogens, progestogens, and phenols and their metabolites in potable water and river water by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 100, p. 83-94, 2012.

WANG, L. et al. Assessing estrogenic activity in surface water and sediment of the Liao River system in northeast China using combined chemical and biological tools. **Environmental Pollution**, v. 159, p. 148-156, 2011.

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

WEI, Y.; JIN-MING, L. Progress in sample pretreatment for analysis of estrogens with liquid chromatography-mass spectrometry. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 38, n. 4, p. 598-606, 2010.

WENZEL, A.; MÜLLER, J.; TERNES, T. **Study on endocrine disrupters in drinking water**. Wiesbaden: Institute for Water Research and Water Technology, 2003. Final Report.

WHYTE, J. J. et al. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 30, n. 4, p. 347-570, 2000.

YAN, S. et al. Emerging contaminants of environmental concern: source, transport, fate, and treatment. **Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management**, v. 14, n. 1, p. 1-19, 2010.

YAN, Z. H.; LU, G. H.; YANG, X. F. Single and combined effects of estrone and 17 $\beta$ -estradiol on Male Goldfish. **Biomedical and Environmental Science**, v. 26, n. 3, p. 176-184, 2013.

ZACHAREWSKI, T. R. *In vitro* bioassays for assessing estrogenic substances. **Environmental Science and Technology**, v. 31, n. 3, p. 613-623, 1997.

ZENG, Y-H.; LUO, X-J.; CHEN, H-S. Method for the purification of polybrominated diphenyl ethers in sediment for compound-specific isotope analysis. **Talanta**, v. 111, p. 93-97, 2013.

ZHANG, F. et al. Residue dynamics of pyraclostrobin in peanut and field soil by QuEChERS and LC-MS/MS. **Ecotoxicology and Environment Safety**, v. 78, p. 116-122, 2012.

ZHANG, J. F. et al. Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. **Ecotoxicology and Environment Safety**, v. 58, n. 1, p. 110-116, 2004.

ZHANG, X. et al. Levels of estrogenic compounds in Xiamen Bay sediment, China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, p. 1210-1216, 2009.

ZOCOLO, G. J. et al. Determination of estrogens (estriol,  $\beta$ -estradiol, estrone and 17 $\beta$ -ethynylestradiol) in river water from a rural area in Midwest Brazil. **Toxicology Letters**, v. 196, p. S63-S63, 2010.

## **APÊNDICES**

### Apêndice A – Teste t de comparação dos limites de detecção.

pag 49,50											
											95%,n-1
	Ld validação	LD Bau Fev	Di	Di - Dm	(Di - Dm)2	sd	tcalc	ttab			
estrona	592,5	418,6	-173,91015	-130,01385	16903,6	86,67957	-1,012841	3,182446	lgual		
estradiol	0,2	0,7	0,46061696	44,3569245	1967,537						
estriol	0,8	0,2	-0,6463532	43,2499543	1870,559						
etinilestradiol	1,9	0,4	-1,4893408	42,4069667	1798,351						
			sum	-175,58523	22540,05						
			dm	-43,896308							
	Ld validação	LD Bau Set	Di	Di - Dm	(Di - Dm)2	sd	tcalc	ttab			
estrona	592,5	523,1	-69,375112	-59,971189	3596,544	41,51872	-0,452997	3,182446	lgual		
estradiol	0,2	6,4	6,15111112	15,5550334	241,9591						
estriol	0,8	26,8	25,9668461	35,3707683	1251,091						
etinilestradiol	1,9	1,5	-0,3585346	9,0453877	81,81904						
			sum	-37,615689	5171,413						
			dm	-9,4039223							
	Ld validação	LD AQA Fev	Di	Di - Dm	(Di - Dm)2	sd	tcalc	ttab			
estrona	592,5	724,3	131,802213	96,0792377	9231,22	64,10182	1,1145697	3,182446	lgual		
estradiol	0,2	5,8	5,59756682	-30,125409	907,5403						
estriol	0,8	6,1	5,33621652	-30,386759	923,3551						
etinilestradiol	1,9	2,1	0,15590562	-35,56707	1265,016						
			sum	142,891902	12327,13						
			dm	35,7229756							
	Ld validação	LD AQA Set	Di	Di - Dm	(Di - Dm)2	sd	tcalc	ttab			
estrona	592,5	1100,6	508,125594	374,335443	140127	249,6325	1,071897	3,182446	lgual		
estradiol	0,2	0,6	0,35409187	-133,43606	17805,18						
estriol	0,8	13,6	12,7638378	-121,02631	14647,37						
etinilestradiol	1,9	15,8	13,9170816	-119,87307	14369,55						
			sum	535,160605	186949,1						
			dm	133,790151							

## Apêndice B – Caracterização do sedimento utilizado para otimização do método.

### Análise Granulométrica por Pipetagem e Peneiramento

Amostra: Sedimento testemunha

Peso total inicial = 30.00g Peso de seixos = 0.00g

Peso total final = 29.10g Fator de correcao= 1.03

granulometria (mm)	(fi)	pesos (g)	porcentagens simples	retidas acumulada
4.000-2.830	-1.5	0.00	0.00	0.00
2.830-2.000	-1.0	0.00	0.00	0.00
2.000-1.410	-0.5	0.00	0.00	0.00
1.410-1.000	0.0	0.00	0.00	0.00
1.000-0.710	0.5	0.00	0.00	0.00
0.710-0.500	1.0	0.00	0.00	0.00
0.500-0.354	1.5	0.00	0.00	0.00
0.354-0.250	2.0	0.01	0.03	0.03
0.250-0.177	2.5	1.15	3.95	3.99
0.177-0.125	3.0	3.14	10.79	14.78
0.125-0.088	3.5	3.06	10.52	25.29
0.088-0.062	4.0	2.24	7.70	32.99
0.062-0.031	5.0	5.50	18.90	51.89
0.031-0.016	6.0	4.50	15.46	67.35
0.016-0.008	7.0	2.50	8.59	75.95
0.008-0.004	8.0	3.00	10.31	86.25
< 0.004	>9.0	4.00	13.75	99.99

% seixos = 0.00                      % silte = 53.26  
 % granulos= 0.00                    % argila= 13.75  
 % areia = 32.99

Classificacao de Shepard(1954):silte arenoso

Parametros estatisticos de Folk & Ward (1957)

Diametro Medio= 5.24 silte medio

Desvio Padrao = 2.09 muito pobremente selecionado

Assimetria = 0.22 assimetria positiva

Curtose = 0.73 platicurtica

Coeficiente de Trask= 0.31

Desvio do Quartil = -0.04

C (diametro a 1% da distribuicao)= 0.20

M (diametro a 50% da distribuicao)= 0.03

.pa

### MATÉRIA ORGÂNICA EXTRAÍDA POR QUEIMA.- Amostra seca (liofilizada).

Amostra	N.C.	P.C.	P.S.	P.Q.	S.S	S.Q	M.O	%M.O
Sed. Test.	24	14,42	18,51	17,98	4,09	3,56	0,53	12,95844

**Apêndice C** – Parâmetros físico-químicos das amostras de água coletada no Ribeirão das Cruzes (Araraquara) no mês de Fevereiro e Setembro/2013. Os valores de cada mês estão separados por travessão (Fev/Set).

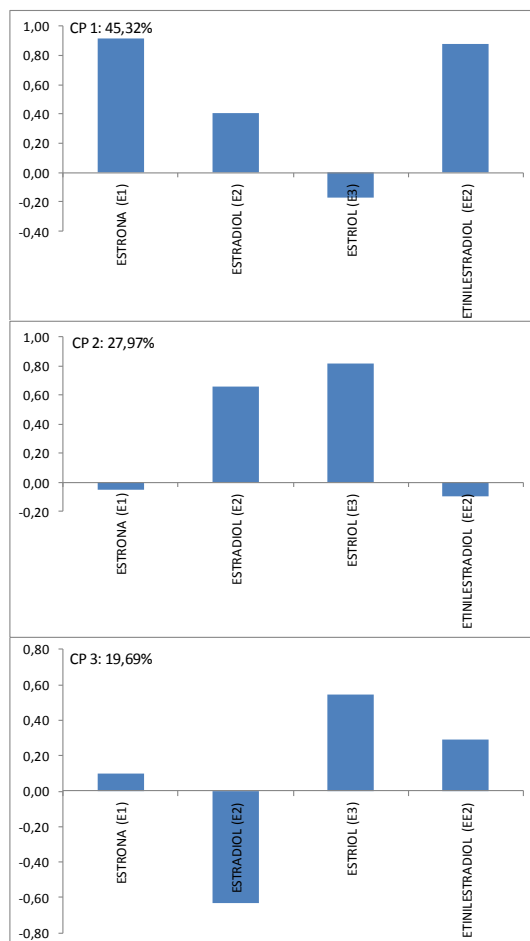
	pH	Temp (° C)	Cond ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	OD ( $\text{mg L}^{-1}$ )	P <sub>total</sub> ( $\text{mg L}^{-1}$ )	N <sub>total</sub> ( $\text{mg L}^{-1}$ )	NO <sub>3</sub> ( $\text{mg L}^{-1}$ )	NO <sub>2</sub> ( $\text{mg L}^{-1}$ )	DBO ( $\text{mg L}^{-1}$ )	DQO ( $\text{mg L}^{-1}$ )
Pto 1	6,7/6,7	27,3/25,0	38,5/37,5	2,7/3,5	<0,5/<0,1	0,3/0,1	0,05/<0,05	0,02/<0,01	3,4/19,0	<20/38,0
Pto 2	6,9/7,0	28,3/24,3	50,3/39,6	4,0/4,4	<0,5/<0,1	0,2/0,5	0,02/0,3	<0,01/<0,01	3,0/20,0	<20/39,0
Pto 3	6,6/6,6	24,1/22,5	62,8/48,6	3,9/2,1	<0,5/<0,1	0,1/0,1	0,03/<0,05	<0,01/<0,01	3,8/17,0	<20/33,0
Pto 4	6,8/6,9	23,4/21,9	58,9/46,0	4,8/5,0	<0,5/<0,1	0,2/0,3	0,02/<0,05	<0,01/<0,01	2,4/13,0	<20/29,0
Pto 5	7,1/6,9	24,3/23,6	71,3/62,4	4,6/5,0	<0,5/<0,1	0,4/0,9	0,15/0,8	0,1/0,03	3,0/10,0	<20/17,0
Pto 6	7,0/7,1	25,8/25,7	53,4/48,5	4,3/4,9	<0,5/<0,1	0,2/0,9	0,02/0,7	<0,01/0,05	2,2/19,0	<20/40,0
Pto 7	6,7/6,7	25,2/25,5	62,7/16,8	4,3/4,2	<0,5/<0,1	0,02/<0,05	0,02/<0,05	<0,01/<0,01	2,7/17,0	<20/19,0
Pto 8	6,8/7,2	25,1/25,8	54,2/50,9	4,2/4,4	<0,5/<0,1	0,3/0,9	0,08/0,8	<0,01/0,03	3,2/15,0	<20/30,0
Pto 9	6,4/6,5	25,5/24,3	34,7/27,3	3,4/4,1	<0,5/<0,1	0,3/0,09	0,02/<0,05	<0,01/<0,01	2,5/36,0	<20/60,0
Pto 10	n.a./7,5	n.a./26,2	n.a./72,7	n.a./2,2	n.a./<0,1	n.a./1,46	n.a./0,1	n.a./0,1	n.a./30,0	n.a./46,0
Pto 11	6,9/7,2	28,7/27,8	83/96,8	3,2/3,5	<0,5/<0,1	0,7/0,9	0,5/0,7	<0,01/0,2	4,2/31,0	<20/55,0
Pto 12	6,4/6,7	27,2/26,4	34,5/25,5	3,5/4,1	<0,5/<0,1	0,3/0,06	0,02/<0,05	<0,01/<0,01	5,2/22,0	<20/44,0
Pto 13	6,7/6,9	27,1/27,0	55,6/58,0	2,9/4,1	<0,5/<0,1	0,3/0,4	0,1/0,3	<0,01/0,02	1,8/25,0	<20/45,0
Pto 14	6,9/7,4	29,6/27,4	208/338,3	3,3/3,7	1,2/0,2	19,4/23,8	15,2/0,08	3,9/0,07	2,4/40,0	<20/67,0
Pto 15	7,2/7,7	26,4/25,0	73,9/69,8	4,6/4,4	<0,5/<0,1	0,4/0,9	0,3/0,6	<0,01/0,2	3,5/20,0	<20/36,0

n.a. – não analisado

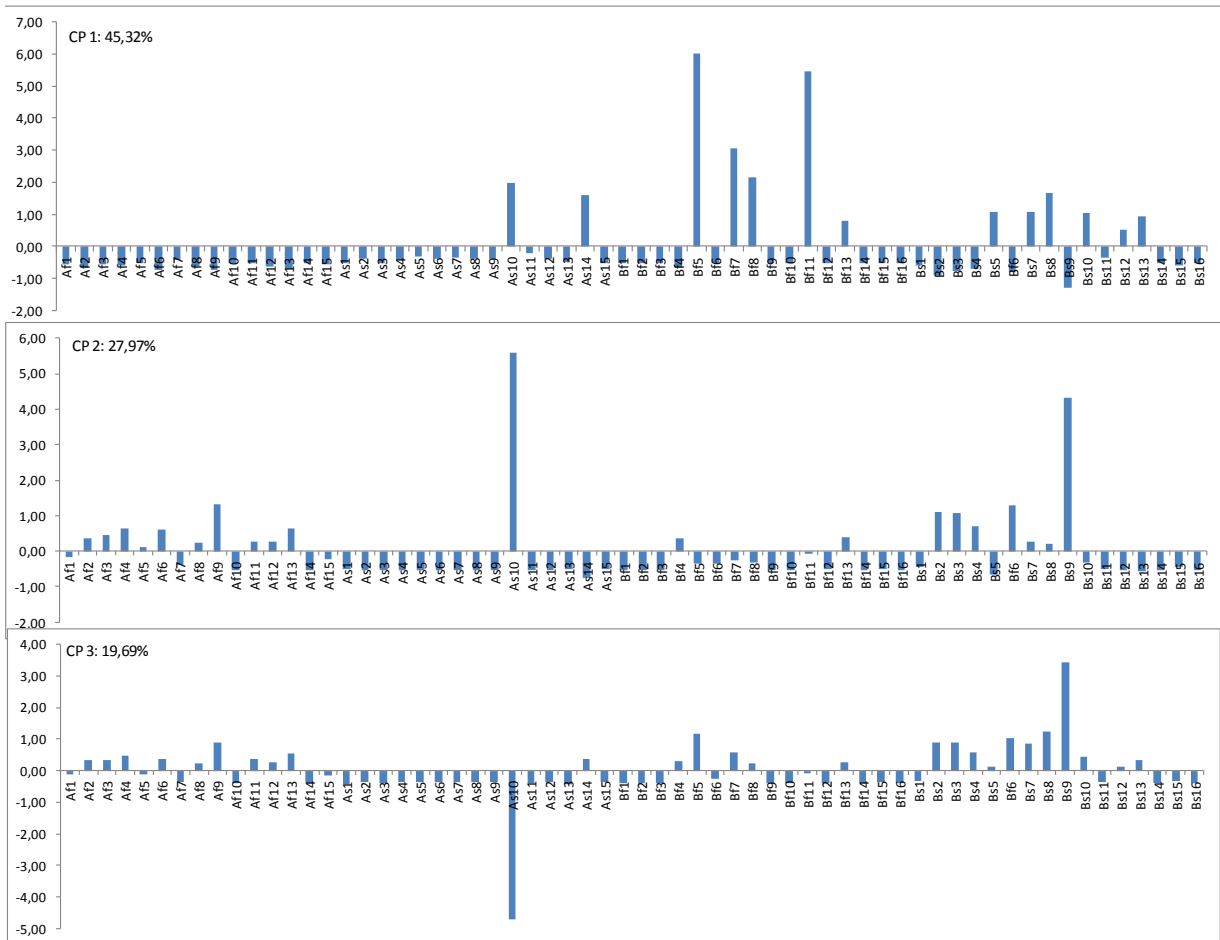
**Apêndice C** – Parâmetros físico-químicos das amostras de água coletada no Rio Bauru (Bauru) nos meses de Fevereiro e Setembro/2013. Os valores de cada mês estão separados por travessão (Fev/Set).

	pH	Temp (° C)	Cond ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	OD* ( $\text{mg L}^{-1}$ )	P <sub>total</sub> ( $\text{mg L}^{-1}$ )	N <sub>total</sub> ( $\text{mg L}^{-1}$ )	NO <sub>3</sub> ( $\text{mg L}^{-1}$ )	NO <sub>2</sub> ( $\text{mg L}^{-1}$ )	DBO ( $\text{mg L}^{-1}$ )	DQO ( $\text{mg L}^{-1}$ )
Pto 1	7,7/7,0	25,0/17,0	68,8/63,1	6,4	<0,5/<0,1	2,25/0,4	0,8/0,3	0,02/<0,01	2,9/16,0	<20/32
Pto 2	7,6/7,0	24,0/17,3	153,8/118,2	4,3	<0,5/<0,1	3,8/2,0	0,5/1,2	0,1/0,4	2,1/14,0	<20/24,0
Pto 3	7,6/7,0	26,0/17,7	170,3/111,7	3,8	<0,5/<0,1	7,3/4,7	4,6/3,6	0,4/1,0	1,9/5,0	<20/16,0
Pto 4	7,7/7,2	26,0/19,0	255,0/273,2	4,7	<0,5/<0,1	14,1/28,2	12,0/26,0	0,6/1,7	2,5/<5	<20/8,0
Pto 5	7,4/6,9	27,5/19,3	407,0/383,5	2,4	1,3/2,4	9,3/19,0	0,6/<0,05	<0,01/<0,01	107/127	184,0/208,0
Pto 6	7,5/7,2	28,0/19,7	327,0/196,1	3,8	<0,5/<0,1	15,2/15,7	11,0/12,2	0,9/3,4	2,2/<5	<20/<5
Pto 7	7,2/6,8	28,0/20,9	469,0/515,3	1,4	1,7/2,7	38,1/28	24,0/<0,05	<0,01/<0,01	89,0/121,0	140,0/232,0
Pto 8	7,3/6,9	29,0/21,7	449,0/493,3	1,9	1,7/2,2	35,1/22,3	22,0/<0,05	<0,01/<0,01	98,0/79,0	149,0/176,0
Pto 9	7,5/7,1	29,0/23,5	193,6/220,0	4,1	<0,5/<0,1	7,9/14,7	4,0/14,0	1,0/0,2	1,8/<5	<20/16,0
Pto 10	7,2/7,0	29,5/22,0	430,0/450,5	1,5	1,5/2,1	23,3/12,2	11,0/<0,05	<0,01/<0,01	92,0/78,0	145,0/194,0
Pto 11	7,2/6,9	28,7/27,0	380,0/355,2	1,9	0,7/1,0	21,5/9,2	15,0/<0,05	0,1/<0,01	86,0/156,0	130,0/240,0
Pto 12	7,3/6,8	29,0/27,2	438,0/480,0	1,7	0,64/2,0	30,9/15,4	22,0/<0,05	<0,01/<0,01	89,0/132,0	120,0/216,0
Pto 13	7,1/6,8	31,0/27,2	473,0/512,5	0,8	1,2/2,2	28,1/18,4	21,0/<0,05	<0,01/<0,01	140,0/126,0	210,0/224,0
Pto 14	7,2/6,9	27,0/26,0	50,3/265,3	3,5	<0,5/<0,1	1,7/3,2	0,2/2,4	0,1/0,4	1,9/6,0	<20/16,0
Pto 15	7,1/7,0	30,0/24,1	319,0/60,7	4,3	<0,5/<0,1	12,3/22,6	9,0/22,0	0,1/0,2	73,0/9,0	100,0/32,0

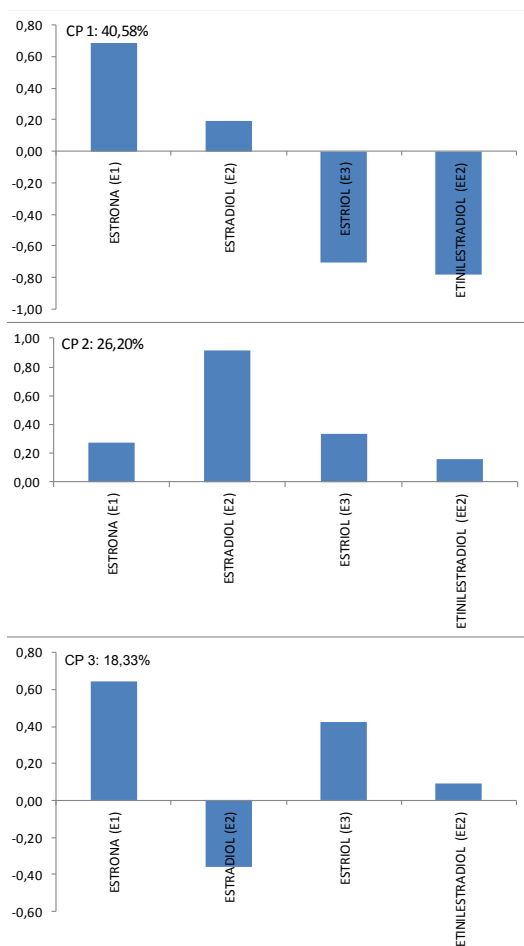
\*valores de OD somente para Setembro.

**Apêndice D – Histogramas de loadings e scores para matriz água**

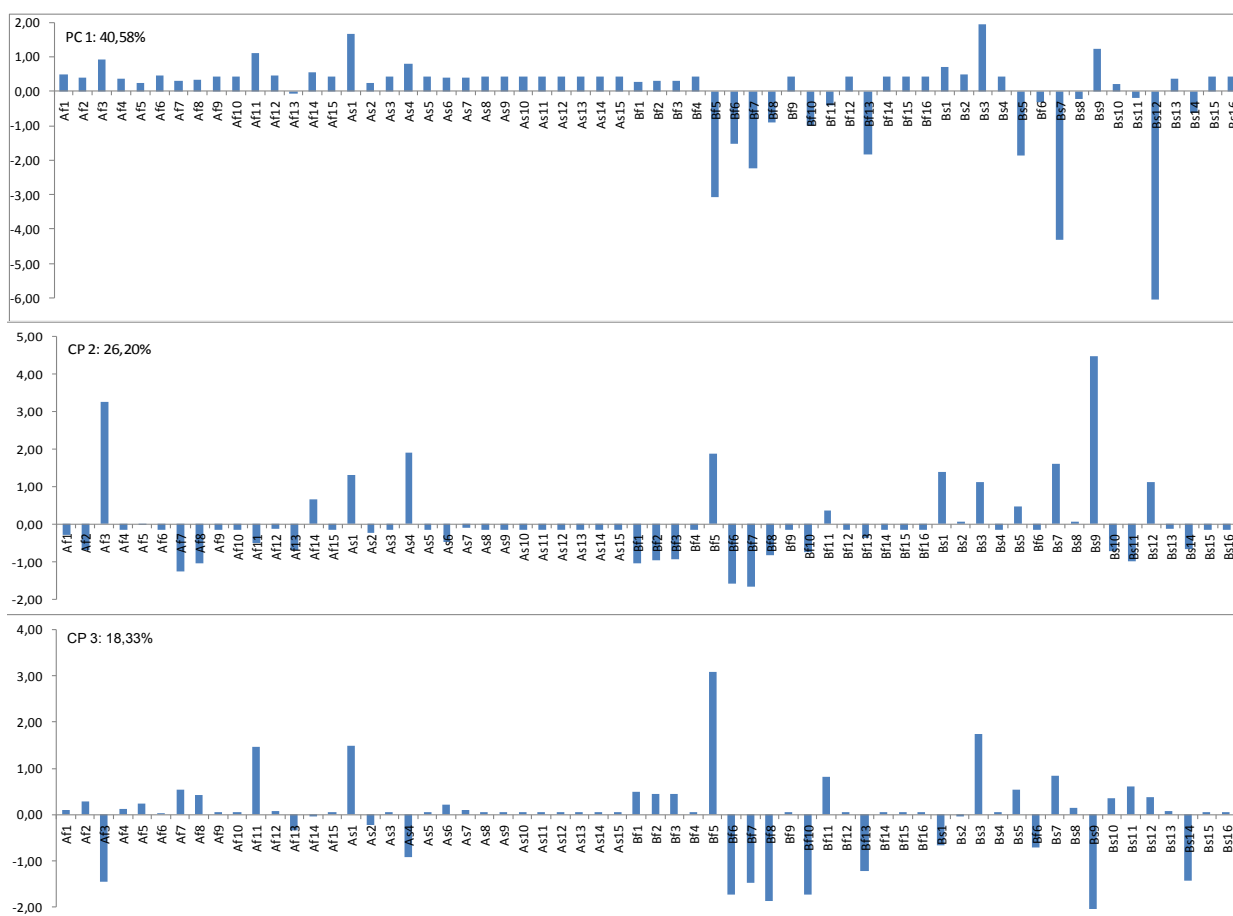
### Apêndice D – Histogramas de loadings e scores para matriz água



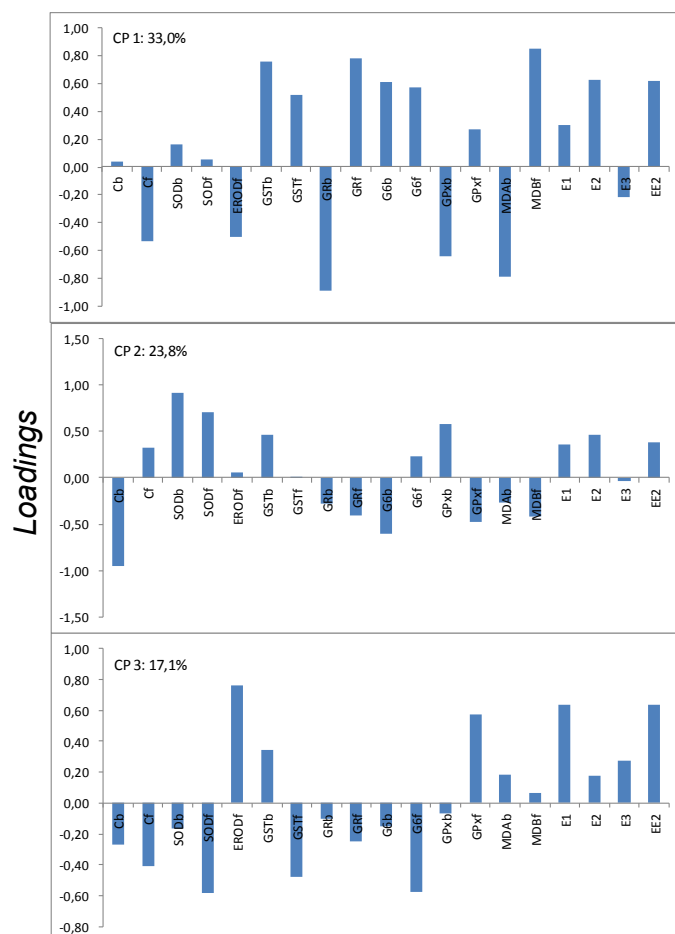
**Apêndice E** – Histogramas de loadings e scores para matriz material particulado em suspensão.

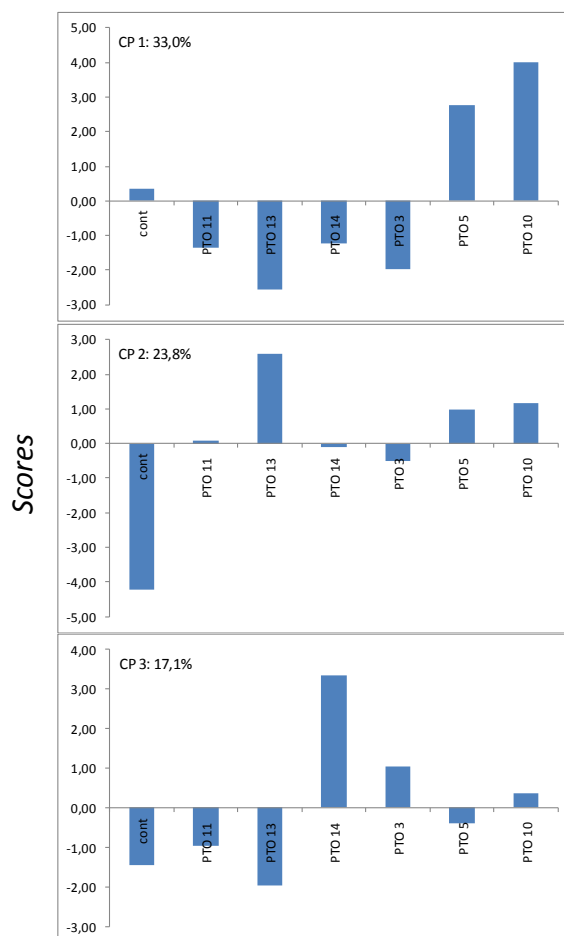


## Apêndice E – Histogramas de loadings e scores para matriz material particulado em suspensão.



## Apêndice F – Histogramas de loadings e scores para as enzimas de biotransformação.



**Apêndice F – Histogramas de loadins e scores para as enzimas de biotransformação.**

**Apêndice G** – Dados de temperatura e dias com chuva observados pela Defesa Civil do Estado de São Paulo

