

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS DEPARTAMENTO DE GEOLOGIA
– LAGEMAR PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DINÂMICA
DOS OCEANOS E DA TERRA

Determinação de Atividade Estrogênica e Detecção de
Micropoluentes em Sedimentos de Fundo na Baía de
Guanabara

Ana Dalva de Oliveira Santos

NITERÓI

2017

Ana Dalva de Oliveira Santos

**Determinação de Atividade Estrogênica e Detecção de
Micropoluentes em Sedimentos de Fundo na Baía de
Guanabara**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Dinâmica dos Oceanos e da Terra da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências (Dr.^a). Área de Concentração: Dinâmica dos Oceanos e da Terra.

Orientadores:

Dr. José Antônio Baptista Neto

Dra. Daniele Maia Bila

NITERÓI

2017

**Determinação de Atividade Estrogênica e Detecção de
Micropoluentes em Sedimentos de Fundo na Baía de
Guanabara**

Ana Dalva de Oliveira Santos

Determinação de Atividade Estrogênica e Detecção de Micropoluentes em Sedimentos de Fundo na Baía de Guanabara

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Geologia e Geofísica Marinha da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências (Dr.^a). Área de Concentração: Dinâmica dos Oceanos e da Terra.

Banca Avaliadora:

Professor Dr. José Antônio Baptista Neto (Orientador)
Universidade Federal Fluminense-UFF

Professora Dr.^a Daniele Maia Bila (Coorientadora)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Professor Dr. Gustavo Vaz de Melo
Universidade Federal Fluminense-UFF

Professora Dr.^a Maria José Salles
Pesquisadora Titular - Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental
ENSP / FIOCRUZ

Professora Dr.^a Sarah Dario Alves Daflon
Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ

Professor Dr. Carlos Marclei Arruda Rangel
Professor Adjunto do Departamento de Geografia e Políticas Públicas - IEAR
Universidade Federal Fluminense – UFF

NITERÓI

2017

Ficha catalográfica automática - SDC/BIG

S237d Santos, Ana Dalva de Oliveira
Determinação de Atividade Estrogênica e Detecção de
Micropoluentes em Sedimentos de Fundo na Baía de Guanabara /
Ana Dalva de Oliveira Santos; José Antônio Baptista Neto,
orientador; Daniele Maia Bila, coorientador. Niterói, 2017.
101 f.

Tese (Doutorado)-Universidade Federal Fluminense, Niterói,
2017.

1. Baía de Guanabara. 2. Micropoluentes. 3. Atividade
Estrogênica. 4. Toxicidade. 5. Produção intelectual. I.
Título II. Baptista Neto, José Antônio , orientador. III.
Bila, Daniele Maia, coorientador. IV. Universidade Federal
Fluminense. Instituto de Geociências.

CDD -

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, amigo de todas as horas da vida. A Ele seja toda glória.

Ao meu querido pai Anastácio e minha amada e saudosa mãe Elza (in memoriam), meus irmãos e irmãs, sobrinhos e cunhadas. Em especial meus sobrinhos Nany e Melk (por conviver com o melhor e pior de mim) Calebe, Davi, Débora (meus amores) e Amanda (que trouxe muita alegria chegando neste finalzinho de ano).

A minha amiga Marília, parceira de vida, ainda bem que tenho você ao meu lado (amizade blindada), obrigada é pouco. As amigas Rejany, Adriana, Selma, Andreia e todas as demais vocês são especiais com certeza.

Ao meu orientador, Dr. José Antônio Baptista Neto, que foi o primeiro a acreditar que este sonho era possível. Seu apoio nesta reta final foi fundamental para minha sanidade.

A minha orientadora Dr.^a Daniele Maia Bila, minha admiração pela pesquisadora que é, sempre com uma palavra de carinho e amizade. Além de conseguir soluções para as mais desafiadoras questões científicas.

Os professores (as), Dr. Gustavo Vaz de Melo, Dr.^a Maria José Salles, Dr.^a Sarah Dario Alves Daflon e Dr. Carlos Marclei Arruda Rangel por aceitarem o convite para esta banca e pelas contribuições em seminários e na qualificação.

Ao laboratório de Caracterização Molecular e Espectrometria de Massas-UFOP e o Coordenador do laboratório, Prof. Dr. Robson J. C. F. Afonso. Principalmente a responsável técnica Ananda Lima Sanson pela fundamental contribuição.

A Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Geologia e Geofísica Marinha, aos professores e as atenciosas secretárias e demais funcionários.

A Coordenação do Laboratório de Engenharia Sanitária da LES-UERJ, por toda ajuda e parceria todos esses anos, pelos amigos e amigas Louise (minha pequena), Aninha, Giselle, Vicente, Allan, Jair, Sidnei, Vitor, Dani Lima, Camila e os não citados, mas queridos também. Minha gratidão!

A CAPES, CNPq e FAPERJ, agências brasileiras que têm financiado projetos e concedido bolsa para a conclusão da pesquisa.

**“Nele estão ocultos todos os tesouros da sabedoria e do conhecimento”.
Colossenses 2:3**

RESUMO

A Baía de Guanabara é um dos ambientes mais poluídos do litoral brasileiro recebendo grandes quantidades de efluentes sanitários, resíduos industriais, urbanos e agrícolas, fármacos, entre outros. A presença de poluentes em corpos hídricos se agrava por questões de saneamento e ineficiência dos processos de tratamentos convencionais das estações de tratamento de água (ETA) e de esgoto (ETE). A necessidade de quantificar, detectar e entender a ação de micropoluentes mesmo em baixas concentrações é na atualidade uma preocupação da comunidade científica à nível mundial. Entre os riscos da presença de compostos desreguladores endócrinos para humanos estão: ovários policísticos, infertilidade e vários tipos de cânceres entre outros. Em animais: masculinização, feminilização, condição de intersex, diminuição na eclosão de ovos e em alguns casos até a extinção da espécie. Logo, o desenvolvimento de metodologias e ensaios que avaliam os riscos ambientais acerca dos DEs é um desafio permanente. O objetivo deste trabalho consiste em investigar a presença de desreguladores endócrinos nos sedimentos de fundo da Baía Guanabara. Foram realizados ensaios *in vitro* *Yeast Estrogen Screen* (YES); cromatografia por CLAE/FLU; cromatografia GC/MS e ensaios de toxicidade aguda com a bactéria *Aliivibrio fischeri*. A bactéria *Aliivibrio fischeri* o CE50 entre 0% a 45,21%, com classificação tóxica. No ensaio YES a maioria das amostras apresentaram citotoxicidade entre 2% e 95%. Os valores de EQE₂ quantificados nas amostras mais diluídas foi de 3,125% a 1,56%. Foram identificados os fármacos (naproxeno, ibuprofeno, genfibrozila e diclofenaco); os hormônios naturais e sintéticos estriol (E3), 17β-estradiol (E2), estrona (E1) e o 17α-etinilestradiol (EE2); entre os fenóis (bisfenol A, 4-nonilfenol e 4-octilfenol). Nas amostras da Baía de Guanabara, Jurujuba e nas praias Adão e Eva, as concentrações dos fármacos foi entre 0.04 ng/g e 22.80ng/g. Os resultados obtidos apontam para uma concentração significativa de micropoluentes e para a importância de maior monitoramento dos sedimentos nas áreas estudadas.

Palavras-chave: Baía de Guanabara - Micropoluentes - Atividade Estrogênica – Toxicidade.

ABSTRACT

The Guanabara Bay is one of the most polluted environments in the Brazilian coast, receiving large amounts of sanitary effluents, industrial, urban and agricultural waste, drugs, among others. The presence of pollutants in water bodies is aggravated by sanitation and inefficiency of the conventional treatment processes of water treatment plants (ETA) and sewage (ETE). The need to quantify, detect and understand the action of micropollutants even at low concentrations is currently a concern of the scientific community worldwide. Among the risks of the presence of endocrine disrupting compounds for humans are: polycystic ovaries, infertility and various types of cancers among others. In animals: masculinization, feminization, intersex condition, decrease in egg hatching and in some cases until extinction of the species. Therefore, the development of methodologies and tests that assess environmental risks related to DE is a permanent challenge. The objective of this work was to investigate the presence of endocrine disrupters in the bottom sediments of Guanabara Bay. In the methodology were performed in vitro Yeast Estrogen Screen (YES); HPLC / FLU chromatography; GC / MS chromatography and acute toxicity tests with the bacterium *Aliivibrio fischeri*. In the results with the bacterium *Aliivibrio fischeri* the EC50 was between 6.4% and 45.21%, with toxic classification. In the YES test, most of the samples presented cytotoxicity between 2% and 95%. The quantified EQE2 values in the most diluted samples were 3.125% to 1.56%. Drugs were identified (naproxen, ibuprofen, genfibrozil and diclofenac); the natural and synthetic hormones estriol (E3), 17 β -estradiol (E2), estrone (E1) and 17 α -ethinyl estradiol (EE2); between phenols (bisphenol A, 4-nonylphenol and 4-octylphenol). In samples from Guanabara Bay, Jurujuba and on the beaches Adam and Eve, values were between 0.04 ng / g and 22.80ng / g. The results obtained point to a significant concentration of micropollutants and to the importance of greater sediment monitoring in the studied areas.

Key words: Guanabara Bay - Micropollutants - Estrogenic Activity - Toxicity

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Esquema do sistema endócrino Humano	20
Figura 02	Mecanismo de ação dos Desreguladores Endócrinos	22
Figura 03	Rota dos micropoluentes no ambiente	24
Figura 04	Esquema com prováveis trajetos dos Fármacos no meio ambiente	32
Figura 05	Mapa da Baía de Guanabara	39
Figura 06	Mapa da localização dos pontos coletados na Baía de Guanabara	42
Figura 07	Mapa do Canal do Mangue	45
Figura 08	Mapa da Enseada de Jurujuba e Praias Adão e Eva	48
Figura 09	Processo de lavagem e armazenamento da vidraria	50
Figura 10	Draga Van Veen e material de apoio	51
Figura 11	Fluxograma do preparo das amostras de sedimento para ensaio YES	52
Figura 12	Esquema das etapas do processo de extração em fase sólida	56
Figura 13	Esquema de preparo do elutriado	64
Figura 14	Curva dose-resposta do controle positivo 17β -estradiol no ensaio YES.	75
Figura 15	Curvas dose-resposta das amostras de sedimento do Canal do Mangue para o ensaio YES. (a) SED 1, (b) SED 2, (c) SED 3, (d) SED 6 e (e) SED 8.	76
Figura 16	Gráficos da curva dose-resposta das amostras da Baía da Guanabara (a) BG6, (b) BG7 e (c) BG8)	77
Figura 17	Curva dose-resposta das amostras de sedimento (a) BG1, (b) BG2, (c) BG2 EDTA, (d)BG10, (e)BG10 EDTA, (f)ADÃO 11, (g) ADÃO 11 EDTA, (h) EVA12, e (i) EVA12 EDTA) no ensaio YES com o emprego do EDTA no preparo da amostra	78/79

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Funções das glândulas endócrinas	21
Tabela 02	Diferentes mecanismos de ação do Desreguladores endócrinos	22
Tabela 03	Substâncias identificadas como DEs	25
Tabela 04	Características físico-químicas dos microcontaminantes analisados neste estudo	29/30
Tabela 05	Cobertura de esgotos no Estado do Rio de Janeiro	38
Tabela 06	Pontos de coleta	41
Tabela 07	Coordenadas dos 05 pontos de coleta sedimento do Canal do Mangue e Rio Maracanã	44
Tabela 08	Dados sobre o produto da derivatização dos analitos	58
Tabela 09	Valores da otimização das condições de GC/MS para separação e determinação dos microcontaminantes	59
Tabela 10	Parâmetros do Método Cromatográfico Otimizado	60/61
Tabela 11	Valores dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) dos microcontaminantes	62
Tabela 12	Escala de Grau de toxicidade adotada por Bulich (1982)	65
Tabela 13	Concentrações de BPA, E3, na Baía de Guanabara	82
Tabela 14	Resultados obtidos nas análises por GC/MS	82
Tabela 15	Micropoluentes detectado em amostras de sedimentos coletadas em vários países	83/84
Tabela 16	Concentrações de micropoluentes no Mundo	85/86
Tabela 17	Resultados obtidos na análise de toxicidade com o organismo-teste <i>Aliivibrio fischeri</i> .	

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS	Absorbância
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CPR	Chlorophenol red
CPRG	Chlorophenol red- β -D-galactopyranoside
C18	Octadecilcilano
DAD	Diode Array Detection
DEs	Desreguladores endócrinos
ETDI	Estação de Tratamento de Resíduos Industriais
EDT	Ácido etilenodiaminotetracético
E 1	Estrona
E 2	17 β -estradiol
E 3	Estriol
EDC	Endocrine disrupters chemicals
EE 2	17 α -etinilestradiol
EFS	Extração em fase sólida
EPA	Environmental Protection Agency
EQ-E ₂	Equivalente 17 β -estradiol
ERE	Elemento de resposta estrogênica
ETA	Estação de tratamento de água
ETE	Estação de tratamento de esgoto
GC	Gas chromatography
HPLC	High Performance / Pressure Liquid Chromatography
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IPCS	International Programme on Chemical Safety
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
Kow	Coeficiente de Partição octanol/água

LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
PR	Potência relativa estrogênica
pKa	Constante de Dissociação Ácida
REh	Receptor de estrogênio humano
RIE	Radioimunoensaio
SPE	Solid Phase Extraction
US EPA	United state environmental protection agency
YES	Yeast estrogen screen

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	OBJETIVOS	19
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	Micropoluentes emergentes	20
3.2	Propriedades Físico-Químicas e Comportamento dos Desreguladores Endócrinos no Ambiente	26
3.3	Desreguladores Endócrinos Esteróis	28
4	Fármacos	31
4.1	Antiinflamatórios	32
4.2	Reguladores lipídicos	33
4.3	Bisfenol A	33
4.4	4-nonifenol	34
4.5	4- octilfenol	34
4.6	Estriol	35
4.7	Estrona	35
4.8	17 β - estradiol	35
4.9	17 α - etinilestradiol	36
5	Ecotoxicidade e sedimentos	36
6	Saneamento e impactos no ambiente	38
7	ÁREA DE ESTUDO	39
7.1	Baía de Guanabara	39
7.2	Canal do Mangue	43
7.3	Breve histórico de Jurujuba e praias Adão e Eva	46
8	MATERIAIS E MÉTODOS	48
8.1	Pontos de amostragem e metodologias de coletas	49
8.2	Preparo das amostras para o Ensaio YES e Cromatografia	50

8.2.1	Lavagem e armazenamento da vidraria	50
8.3	Coleta e acondicionamento das amostras	51
8.4	Preparo das amostras	53
8.4.1	Extração em fase sólida (EPS)	53
8.4.2	<i>Clean up</i> dos cartuchos e reconstituição dos analitos	53
8.5	Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE/FLU) com detector de Fluorescência	54
8.6	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)	55
8.6.1	Derivatização	57
8.6.2	Validação da Metodologia	61
8.7	Toxicidade	63
8.7.1	Ensaio de Toxicidade aguda - organismo-teste <i>Allivibrio fischerie</i>	63
8.8	Ensaio <i>in vitro</i> YES	65
8.8.1	Reagentes usados	65
8.8.2	Preparo das soluções	65
8.8.3	Cepa <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67
8.9	Ensaio YES	68
8.9.1	Curva padrão do controle positivo 17 β -estradiol	69
9	RESULTADOS E DISCUSSÕES	73
9.1	Resultado das amostras do Rio Maracanã, Canal do Mangue e Baía da Guanabara	74
9.1.1	Limite de Detecção e Quantificação	74
9.2	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE/FLU)	81
9.3	Cromatografia gasosa com espectrometria de massas (GC/MS)	82
10	CONCLUSÃO	88/
11	REFERÊNCIAS	89

1. INTRODUÇÃO

Microcontaminantes emergentes, segundo a *United States Environmental Protection Agency* (U.S EPA, 2008) compõem um grupo de substâncias que podem causar apreensões quanto aos seus efeitos no ambiente. Toneladas de micropoluentes são produzidas sem controle prévio e intensamente utilizadas pela população, com descarte inadequado no ambiente, advindo de várias fontes como: esgoto doméstico, resíduos industriais entre outros (KASPRZYK-HORDERN et al., 2008; GÖTZ et al., 2010; OHE et al., 2011).

Nas últimas décadas, vários setores têm demonstrado preocupação com possíveis efeitos prejudiciais, causados em humanos e animais devido à exposição a substâncias químicas presentes no ambiente, que têm o potencial de interferir no sistema endócrino. Dessa forma, muitos estudos vêm se desenvolvendo com a finalidade de compreender a presença e a ação de compostos desreguladores endócrinos (DE) no ambiente.

Diversas organizações governamentais e não governamentais, tais como, União Européia (UE), Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), Organização Mundial de Saúde (OMS), Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) e a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), investigam a questão dos desreguladores endócrinos, disponibilizando alguns relatórios que tratam sobre o monitoramento e a avaliação de metodologias de ensaios para detectar os DE e identificar as substâncias com potencial estrogênico.

No Brasil, foram relatados alguns efeitos relacionados à exposição de desreguladores endócrinos no meio ambiente, como a pesquisa de Fernandez et al. (2002), realizada nos litorais do Rio de Janeiro e em Fortaleza, demonstrando o desenvolvimento de caracteres sexuais masculinos em fêmeas de moluscos, fenômeno conhecido como imposex. Dessa forma, mostra-se relevante o estudo das principais metodologias para detecção, o monitoramento dos micropoluentes emergentes e os principais mecanismos de controle e remoção desses contaminantes, a fim de que se minimize os impactos ambientais.

A matriz analisada neste estudo são sedimentos devido suas características em se comportar muitas vezes, como depósitos e prováveis

fontes de poluição (JAFFÉ, 1991; GEBREMARIAM et al., 2012). Assim, sedimentos podem ser foco de contaminantes, mesmo em casos em que as fontes de contaminação já tenham sido eliminadas (ROCHA et al., 2009). Segundo Poletto e Mertem (2006), sedimentos e solos podem remover e/ou liberar íons por adsorção e desorção, além de sua capacidade de transporte e armazenamento. Para tanto, é necessário levar em conta as características do sedimento, o meio em que está e os poluentes disponíveis no local para uma avaliação precisa.

Tais fatos demonstram a urgência nas pesquisas sobre o tema, que ofereçam mais esclarecimentos sobre a exposição ambiental e a qualidade das águas superficiais, subterrâneas e marinhas (PEREZ, et al., 2006). Neste sentido esta tese obedece a seguinte estrutura: introdução; objetivos; revisão bibliográfica; 4) descrição da área de estudo; materiais e métodos; resultados e discussões; conclusão e referências.

2.OBJETIVOS

Geral:

O objetivo geral do trabalho foi investigar a presença de desreguladores endócrinos nos sedimentos da Baía Guanabara pela avaliação da atividade estrogênica utilizando o ensaio YES e pela identificação e quantificação dos microcontaminantes como os fármacos (ibuprofeno, paracetamol, genfibrozila e diclofenaco), hormônios naturais e sintéticos estradiol (E3), 17 β -estradiol (E2), Estrona (E1) e o 17 α -etinilestradiol (EE2) e os fenóis (bisfenol A, 4-nonilfenol e 4-octilfenol) por CLAE/FLU e GC/MS

Específicos

- Avaliar a atividade estrogênica presente nos sedimentos da Baía de Guanabara;
- Avaliação da citotoxicidade;
- Identificar e quantificar a presença dos analitos alvos em amostras sedimentos;
- Investigar a interferência da toxicidade através do ensaio com a bactéria *Aliivibrio Fischeri*;
- Contribuir com dados que corroborem para implementação de futuras legislações e ações preventivas e mitigadoras.

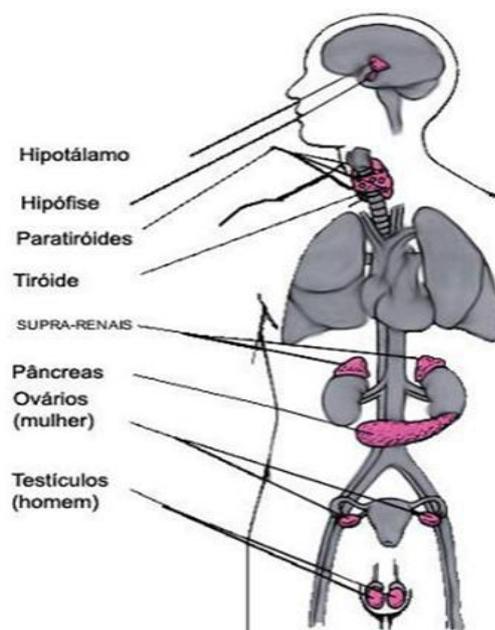
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Micropoluentes emergentes

Os micropoluentes emergentes são substâncias que ainda não possuem uma legislação para o seu controle, tanto em nível nacional, como internacional. Essas substâncias são introduzidas no ambiente por meio de ações antropogênicas e são denominadas como desreguladores endócrinos. São substâncias químicas que mesmo em baixas concentrações da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} no ambiente podem acarretar riscos, devido à interferência no sistema endócrino dos seres vivos.

O sistema endócrino caracteriza-se por um conjunto de glândulas localizadas em diferentes partes do corpo com funções específicas. A Figura 01 representa um esquema do sistema endócrino e a localização das glândulas, enquanto a Tabela 01 as principais funções de cada hormônio.

Figura 01 - Esquema do sistema endócrino humano



Fonte: (SILVA & COLLINS).

Tabela 01 Funções das glândulas endócrinas

GLÂNDULA	PRINCIPAIS FUNÇÕES
Hipotálamo	Estimula a secreção de tireotrofina (TSH) e prolactina.
	Produz a liberação de adrenocorticotrófico (ACTH).
	Causa a liberação do hormônio de crescimento.
	Induz a liberação de luteinizante (LH) e de foliculoestimulante (FSH).
	Inibe a liberação de prolactina.
Hipófise anterior	Estimula a síntese de proteínas e o crescimento global da maioria dos tecidos.
	Estimula a síntese e a secreção dos hormônios tireóides.
	Estimula a síntese e a secreção dos hormônios adrenocorticais.
	Promove o desenvolvimento das mamas femininas e a secreção do leite.
	Causa o crescimento dos folículos nos ovários e a maturação dos espermatozóides, nas células de Sertoli, dos testículos.
Hipófise posterior	Estimula a síntese de testosterona das células de Leydig dos testículos; estimula a ovulação, a formação do corpo lúteo e a síntese de estrogênio e progesterona nos ovários.
	Aumenta a reabsorção de água pelos rins e causa vasoconstrição e elevação da pressão arterial.
Tireóide	Aumenta a velocidade das reações químicas na maioria das células, aumentando assim o metabolismo corporal.
	Promove a deposição de cálcio nos ossos e a concentração de íons cálcios no líquido extracelular.
Córtex adrenal	Possui múltiplas funções metabólicas no controle do metabolismo das proteínas, carboidratos e gorduras; tem também efeito anti-inflamatório.
	Aumenta a reabsorção renal de sódio e a secreção de íons hidrogênio
Pâncreas	Promove a entrada de glicose em muitas células e dessa maneira controla o metabolismo dos carboidratos
	Aumenta a síntese e a liberação de glicose pelo fígado
Paratireóide	Controla concentração sérica de íons cálcio aumentando a absorção de cálcio pelo intestino e pelos rins e liberando cálcio dos ossos.
Testículos	Promove o desenvolvimento do sistema reprodutor masculino e os caracteres sexuais secundários masculinos.
Ovários	Promove o crescimento e o desenvolvimento do sistema reprodutor feminino, das mamas femininas e dos caracteres sexuais secundários femininos.
	Estimula a secreção do "leite uterino" pelas glândulas endometriais do útero e promove o desenvolvimento do aparelho secretor das mamas.

Fonte: Montagner, (2013)

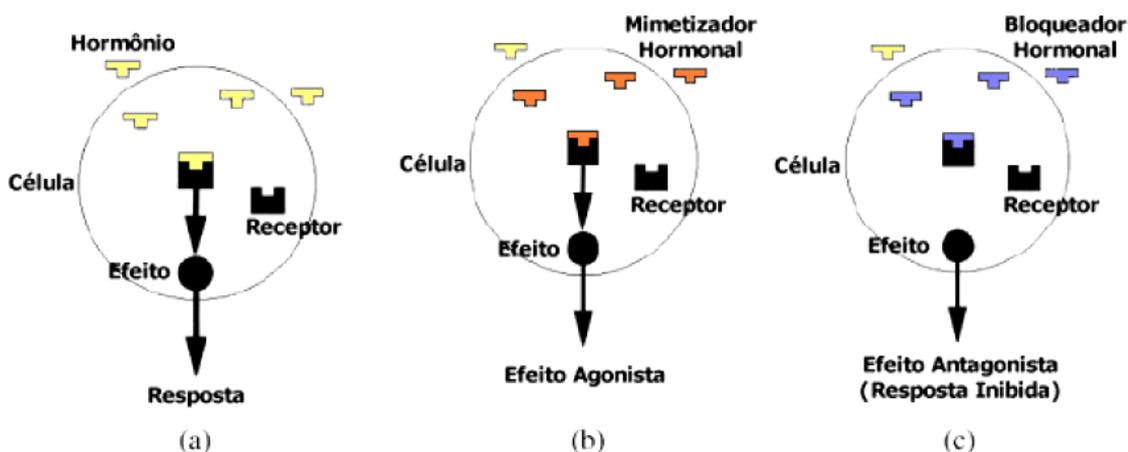
Os Desreguladores endócrinos são conhecidos por várias nomenclaturas entre elas *endocrine disruptors* (EDs) e *endocrine disrupting compounds or chemicals* (EDCs). A contaminação por Desreguladores endócrinos pode ser de forma pontual, já que a descarga acontece de forma direta no ambiente e por fontes não pontuais, as quais elevam o nível de dificuldade de detecção e, conseqüentemente, o tratamento e a eliminação. (GHISELLI & JARDIM 2007).

As substâncias denominadas desreguladores endócrinos possuem estruturas químicas diferentes. Sua ação é observada pela ligação direta por sistemas enzimáticos em receptores nucleares, de membrana, esteróides, não esteróides, abrangendo neurotransmissores (CASTRO-CORREIA; FONTOURA, 2015). Essa estrutura está envolvida diversas funções vitais,

dentre elas os receptores nucleares (RNs), responsáveis pelo desenvolvimento fetal, homeostase, reprodução e metabolismo.

Em uma ação normal, um hormônio natural se liga a um receptor hormonal específico. Todavia, os desreguladores endócrinos também podem fazer essa ação acarretando diferentes respostas (KABIR; RAHMAN, M. S.; RAHMAN, I., 2015; KIYAMA; WADA-KIYAMA, 2015; SWEDENBORG et al., 2009). Na Figura 02 está representado o mecanismo de ação de um hormônio natural e de um desregulador endócrino e na tabela 02, os diferentes mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos.

Figura 02: Mecanismo de ação dos desreguladores endócrinos.



Fonte: Adaptado de (BIRKETT e LESTER, 2003).

Tabela 02. Diferentes mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos.

MECANISMO DE AÇÃO	DEFINIÇÃO
Mimetizar	Um desregulador endócrino pode ligar-se ao receptor de um hormônio e enviar mensagens aos genes receptores. Mensagens enviadas no momento impróprio ou superprodução de mensagens têm efeitos adversos em funções biológicas
Simular	Alguns desreguladores endócrinos são capazes de simular a formação de mais receptores de hormônios nas células, levando a amplificação de sinais.
Bloquear	Pela ocupação do receptor na célula alguns desreguladores endócrinos, são capazes de bloquear o hormônio natural, impedindo que sua função seja exercida. Isso pode aumentar ou diminuir o efeito dependendo se o bloqueador é mais ou menos potente do que o hormônio que está sendo bloqueado.
Destruir	Podem destruir o hormônio ou a capacidade do hormônio de executar a sua função, alterando sua estrutura direta ou indiretamente, fazendo com que o hormônio não se encaixe no sítio receptor.

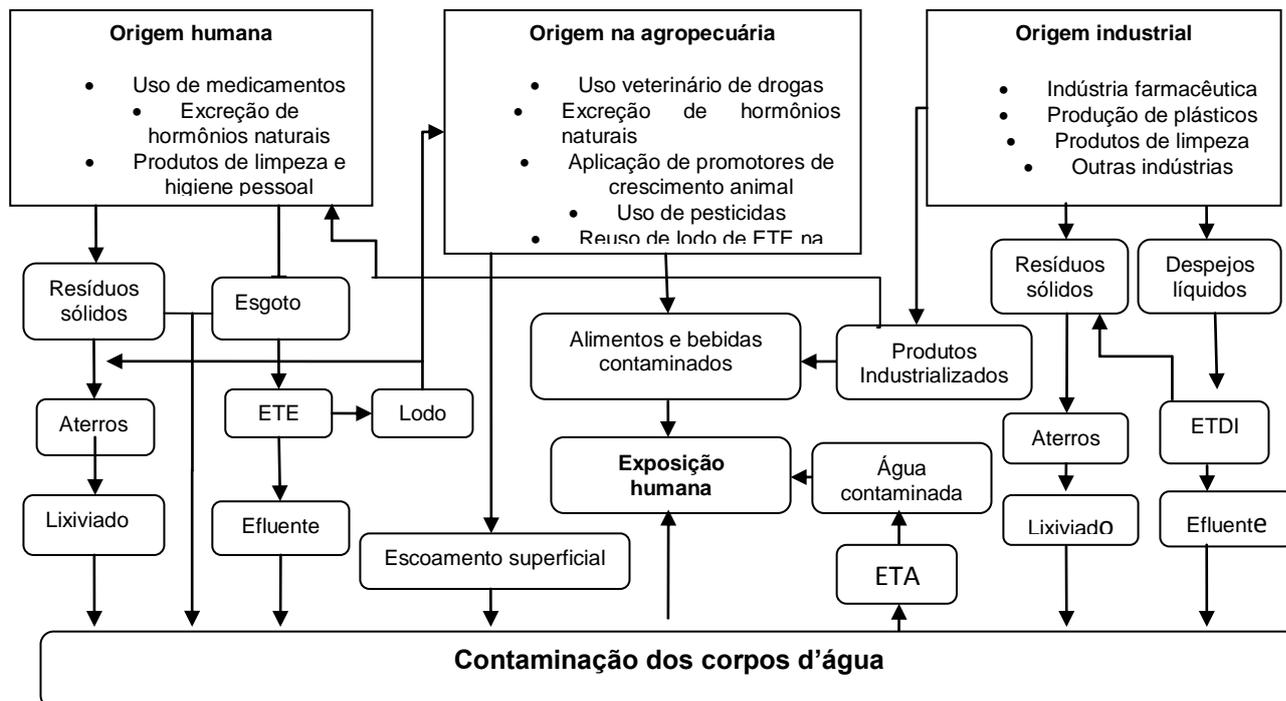
Fonte: Birkett e Lester (2003).

Desreguladores endócrinos são divididos em duas classes: Substâncias naturais: estrogênios que fazem parte do organismo, estriol (E3) estrona (E1) e o 17 β - estradiol (E2), os fitoestrogênios e as substâncias sintéticas: pesticidas, fungicidas, herbicidas e moluscicidas, bem como seus subprodutos dentre eles as dioxinas, PCB, alquilfenóis e seus subprodutos, inclusive o bisfenol A e demais compostos, incluindo os farmacêuticos, como o 17 α -etinilestradiol (EE2) (BILA e DEZOTTI, 2007).

A relação entre a exposição ambiental aos micropoluentes e seus efeitos adversos na saúde de humanos e de outros organismos não está completamente estabelecida. Várias substâncias com potencial de causar efeitos negativos em seres vivos estão presentes em amostras ambientais, expondo frequentemente os seres humanos e os outros animais.

Micropoluentes estão presentes em efluentes de estações de tratamento de esgotos (ETE), estações de tratamento de água (ETA), lixiviado, lodos aditivados, sedimentos, águas superficiais e até águas subterrâneas. Nesse sentido, o estudo e a análise desses contaminantes são de grande importância para o desenvolvimento de metodologias analíticas e ensaios *in vitro* e *in vivo*, além de técnicas de monitoramento para quantificar e analisar os efeitos dos desreguladores endócrinos. A Figura 03 apresenta um esquema das Rotas dos micropoluentes no ambiente.

Figura 03. Rotas dos micropoluentes no ambiente



Fonte: Adaptado de Aquino; Brandit; Chernicharo (2013).

Devido à grande importância das pesquisas sobre microcontaminantes emergentes, métodos robustos têm sido desenvolvidos visando à sua determinação nas mais diferentes matrizes. As amostras ambientais são em sua maioria complexas e as concentrações dos compostos de interesse estão normalmente na escala de ($\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1}), o que demanda técnicas de preparo de amostras e técnicas analíticas elaboradas e eficientes (SILVA & COLLINS, 2011).

A pesquisa e a análise da presença dos desreguladores endócrinos e seus efeitos são de suma relevância, pois os efeitos adversos relacionados aos DEs ainda precisam ser estudados a nível nacional e mundial quanto à sua causa-efeito no ambiente, em animais e humanos. Dessa forma, análises individuais e laboratoriais desses compostos têm sido empregadas e contribuído com a pesquisa a nível mundial. Porém análises em matrizes ambientais complexas como água de mananciais, esgotos, sedimentos são poucas, devido à necessidade de lidar com resultados simultâneos de diversos poluentes. Análises confiáveis de um grande número de substâncias químicas

e amostras ambientais requerem ensaios sensíveis e, algumas vezes, específicos.

A contaminação dos corpos hídricos se dá principalmente pelo manejo inadequado dos recursos hídricos, no tratamento da água e do esgoto. Segundo a OMS, a falta de água tratada e de saneamento básico tem acarretado vários tipos de doenças e até levado a morte de indivíduos. Na Tabela 03 estão distribuídas substâncias identificadas como Desreguladores Endócrinos.

Tabela 03 - Substâncias identificadas como DE

Ftalatos Dietilftalato (DEF) di-iso-butilftalato (DIBF) di-n-butilftalato (DBF) butilbenzilftalato (BBF) diciclohexiloftalato (DCHF) di-2-(2-etil-hexil) ftalato (DEHF) di-n-octilftalato (DOF) di-isooctilftalato (DIOF) di-iso-nonilftalato (DINF) di-iso-decilftalato (DIDF)	Pesticidas Inseticidas 2,2 bis-p-clorofenil-1,1,1-tricloroetano (DDT) 2,2 bis-p-clorofenil-1,1-dicloroetileno (DDE) Lindano Deltametrin Carbofurano Herbicidas Atrazina Linuron Fungicidas Vinclozolina Tridemorfos Carbendazina Penconazol Procloraz Procimidona Epoconazol
Alquifenois Nonilfenol (NF) Octilfenol (OF) Nonilfenol etoxilado Octilfenol etoxilado	Agentes terapêuticos e farmacêuticos Dietilestilbestrol (DES) 17 α -etinilestradiol (EE2)
Compostos orgânicos de estanho Tributilestanho (TBE) Trifenilestanho (TFE)	Policlorados de bifenilas (PCB) 2,4,4'-triclorobifenil 2,2',5,5'-tetraclorobifenil 2,2',4,5,5'-pentaclorobifenil 2,3,4,4',5-hexaclorobifenil 2,2',3,4,4',5-hexaclorobifenil 2,2',3,4,4',5,5'-heptaclorobifenil
Furanos e Dioxinas Dibenzo-p-dioxina 2,3,7,8-Tetraclorodibenzeno-p-Dioxina (TCDD) 2,3,7,8-Tetraclorodibenzofurano (TCDF)	Parabenos Benzilparabeno Butilparabeno Etilparabeno Isobutilparabeno n-propilparabeno metilparabeno
Bisfenol Bisfenol A (BPA)	Retardantes de chama bromados Polibromobifenila (PBB) 2,2",4,4"-tetrabromodifenil éter 2,2",4,4",5-pentabromodifenil éter

	2,2",4,4",6-pentabromodifenil éter 2,2",4,4",5,5"-hexabromodifenil éter 2,2",4,4",5,6-hexabromodifenil éter 2,2",3,4,4",5,6-heptabromodifenil éter octabromodifenil éter (BDE octa) decabromociclodifenil éter (BDE 209) hexabromociclododecano (HBCD) tetrabromobisfenol A (TBBA)
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	Fitoestrógenos
Naftalina Acenaftileno Fluoreno Fenantreno Antraceno Fluoranten Pireno Benzo[a]antraceno Criseno Benzo[b]fluoranteno Benzo[k]fluoranteno Benzo[a]pireno Indeno[123-cd]pireno Benzo[ghi]perileno	Isoflavona: daidzeína e genisteína Lignanás: metaresinol e enterodiol
Metais pesados	
Cádmiu Mercúriu Chumbo Zinco	

3.2 Propriedades físico-químicas e comportamento dos desreguladores endócrinos no ambiente

Os hormônios estrogênicos naturais e sintéticos têm chamado a atenção da comunidade científica por seus efeitos na cadeia alimentar e também porque são excretados naturalmente por fêmeas de mamíferos e pelos humanos. Além disso, existem as fórmulas de medicamentos utilizadas para reposição hormonal, contraceptivos, etc. (BIRKETT e LESTER, 2003; GHISELLI e JARDIM, 2007). Nesse contexto, temos que os hormônios estrógenos naturais e sintéticos esteróides se produzem a partir do colesterol e se dividem como: estrógenos, andrógenos e progestrónos (REIS FILHO et al., 2006).

Uma das causas da persistência desses hormônios estrogênicos no ambiente e seus efeitos está atrelada à sua inserção contínua no ambiente através das indústrias, comércio, excreção entre outros (TADEO, 2012; DIRTU et al., 2012). Dentre os estrógenos, o 17 β -estradiol é o que está em maior quantidade e o mais potente, acompanhado pelos Estrona e Estriol. O 17 β -

estradiol é doze vezes mais potente que o estrona e oitenta vezes mais que o estriol (PESSOA, 2012; NAKAMURA et.al, 2002).

Os estrogênios sintéticos são encontrados em produtos farmacêuticos e tiveram suas estruturas moleculares alteradas; dessa forma, são mais potentes e ativos do que os estrogênios naturais e são geralmente utilizados no trato dos sintomas da menopausa, em contraceptivos, alguns cânceres etc. (SUN et al., 2010; RAIMUNDO, 2007). Segundo Combalbert & Hernandez-Raquet (2010) a quantidade recomendada do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol (EE2) para fins terapêuticos está entre 20 - 60 μ g para contracepção e em torno de 10 μ g, para controle da menopausa. Desse modo, contando com uma excreção, em torno de 30-90%, se for contabilizado por habitantes, estima-se que 4,4 kg/ano/milhão de habitantes de estrógenos sejam excretados no meio ambiente por humanos.

Os efluentes domésticos, tanto tratados, quanto *in natura*, são as principais vias de entrada de contaminantes no ambiente (MARFIL-VEGA et al., 2010). Os hormônios naturais são excretados de forma natural para o esgoto e devido à inadequação dos sistemas de tratamento a eliminação desses hormônios não é completa, ocasionando sua entrada no ambiente aquático, no qual a faixa encontrada é de ng L⁻¹ (GONZÁLEZ et al., 2012). As águas superficiais também estão sujeitas a serem vias de entrada de estrogênios através de escoamento superficial de esterco de animais e outros (WENZEL, 2003; TADEO et al., 2012).

Quando esses hormônios chegam ao ambiente aquático, o E2 é biodegradado a E1, que degrada para E3 (LaFLEUR & SCHUG et al., 2011) e podem também ser transportados pelas correntes, biotransformados, passar por oxidação ou redução e serem adsorvidos nos sedimentos e ainda ressuspensos junto com o material particulado. Alguns hormônios encontram-se em equilíbrio como o 17 β -estradiol (forma reduzida) e a estrona (forma oxidada), porém no ambiente aquático e no tratamento de efluentes um estrógeno pode ser transformado em outro em razão da oxidação e condições redutoras do meio (LOPES et al., 2010).

As propriedades físico-químicas e ambientais do meio vão responder sobre a distribuição dos contaminantes no ambiente (AZZOUZ et al., 2012). Tanto os hormônios naturais, quanto sintéticos, são de natureza lipofílica e em

condições de temperatura, pH, salinidade, existência de substâncias húmicas ou material particulado, passam por influência na solubilidade e na sua rota, influenciando na degradação no meio (GABET et al., 2007).

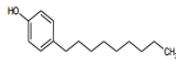
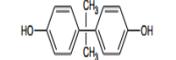
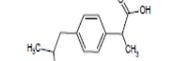
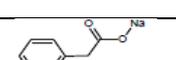
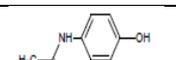
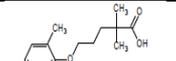
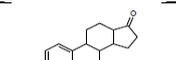
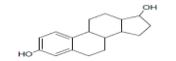
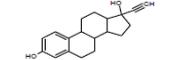
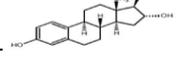
De acordo com Reis Filho e outros (2006), os estrogênios possuem uma meia vida de 2 a 6 dias, considerada curta, porém sua introdução constante no ambiente se comparado a outros micropoluentes faz com que essa meia vida seja potencializada.

3.3 Desreguladores Endócrinos esteróis

O desregulador endócrino sintético, assim como os DEs naturais 17 α -Estradiol, 17 β -Estradiol, Estrona, Estriol, analisados neste estudo, são compostos esteróis. Os compostos assim denominados são utilizados para determinação da matéria orgânica, devido às suas características de quantificação em baixas concentrações, resistência microbiana dentre outras especificidades.

A facilidade dos esteróis se associarem ao material particulado se deve à sua pouca solubilidade em água e resistência à degradação anaeróbica; desse modo, esses compostos se acumulam mais facilmente nos sedimentos (TAKADA et al., 1994). Estudos apontam que o coeficiente de partição octanol-água (Kow) dos compostos quando maior que 4 sugerem hidrofobicidade e, dessa maneira, sua adsorção ao material particulado e seu depósito nos sedimentos ocorrem com maior intensidade (BAYONA & ALBAIGES, 2004). Na tabela 05, estão os micropoluentes analisados neste trabalho, identificados quanto à sua estrutura e outras características.

Tabela 05 – Características físico-químicas dos microcontaminantes analisados neste estudo

Nome (IUPAC)	Sigla	CAS	Estrutura	M. M. (g)	pKa	P. E. (a760mmHg)	Log Kow
4-nonilfenol	4-NF	104-40-5		220, 35046	10,28	330,64°C	5,76
4-octilfenol	4-OF	10806-26-4		206, 32388	10,38	314,57°C	5,50
Bisfenol A	BPA	80-05-7		228, 28634	10,20	400,84°C	3,32
Ibuprofeno	IBU	15687-27-1		206, 28082	4,91 – 5,20	319,64 °C	3,97
Diclofenaco	DCF	15307-86-5		318, 13047	4,15	411,97 °C	4,51
Naproxeno	NPX	22204-53-1		230, 25916	4,15	403,89 °C	3,18
Paracetamol	PCT	103-90-2		151, 16256	9,38	387,83 °C	0,46
Genfibrozila	GEN	25812-30-0		250, 33338	4,50	394,73 °C	4,77
Estrona	E1	53-16-7		270, 36608	10,77	445,17 °C	3,13
17β-estradiol	E2	50-28-1		272, 38196	10,20	445,92 °C	4,01
17α-etiniestradiol	EE2	57-63-6		296, 40336	10,40	457,22 °C	4,12
Estriol	E3	50-27-1		288, 385	10,33	469°C	2,45

*Número no Chemical Abstracts Service; **s**: solubilidade em água; **pKa**: constante de dissociação; **Kow**: coeficiente de partição octanol-água.

Fonte: Adaptado de Bittencourt et al. (2016).

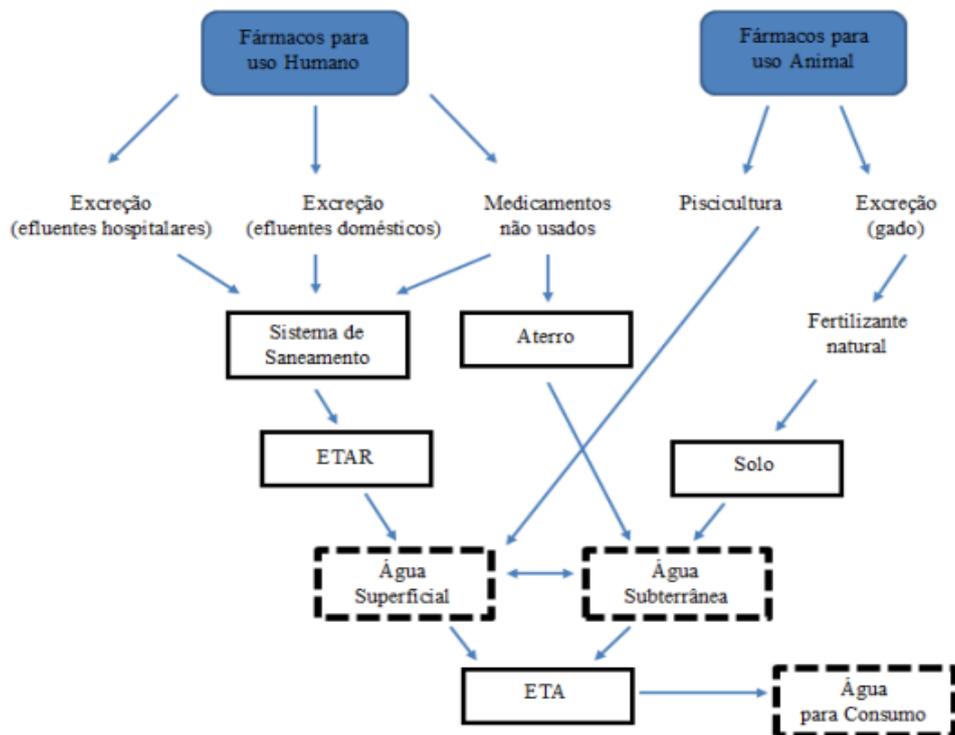
4. Fármacos

O consumo de produtos farmacêuticos é extensivo em todo mundo e a sua utilização torna-se cada vez maior com o crescimento da população, as descobertas de medicamentos e a chegada dos remédios genéricos, que vieram facilitar economicamente o acesso aos medicamentos. Embora os medicamentos sejam necessários por gerar saúde e prevenir doenças, o seu crescente consumo tem aumentado seus resíduos e impactado o ambiente como um todo (JELIC et al., 2012; BOXALL, 2004).

Os dados sobre a contaminação de rios, mares, lençóis freáticos entre outros têm destacado os resíduos de fármacos como uma das causas, principalmente pelo descarte indevido e a falta de um tratamento de água e esgoto adequado. Dessa forma, o uso e descarte inadequados dos fármacos tornam-se uma preocupação. Segundo Bila & Dezotti (2003) resíduos de fármacos no ambiente comprometem negativamente os organismos, ao nível celular, dos órgãos e organismos tanto da população quanto do ecossistema.

Nesse contexto, fármacos sejam de uso humano ou veterinário são a preocupação de cientistas a nível mundial, isso porque, além dos fatores citados, muitos desses medicamentos são contaminantes emergentes. Os contaminantes emergentes podem persistir no ambiente, causando efeitos que podem interferir nos ecossistemas (CELIZ et al., 2009; FARRÉ et al., 2008). A Figura 04 mostra um esquema com prováveis trajetos dos fármacos no meio ambiente.

Figura 4: Esquema com prováveis trajetos dos fármacos no meio ambiente



Fonte: Costa, (2010).

Os microcontaminantes de uma maneira geral podem diminuir no ambiente devido a sanções legais, porém com os fármacos podem até aumentar pelos seus efeitos favoráveis na saúde (TAMBOS et al., 2010). Os fármacos mais encontrados no meio ambiente são: antibióticos, anti-inflamatórios não esteróides, reguladores lipídicos, e hormônios sintéticos (SANTOS et al., 2010). Neste trabalho, iremos analisar 12 microcontaminantes, dentre eles os fármacos.

4.1 Anti-inflamatórios

Dentre os fármacos estudados estão os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE), paracetamol (PCT), ibuprofeno (IBU), naproxeno (NPX) e o diclofenaco (DCF). Esses medicamentos atuam reduzindo a dor e as causas inflamatórias e também a febre.

4.2 Reguladores Lipídicos

Os fármacos denominados de reguladores lipídicos são indicados para diminuir a capacidade do desenvolvimento de doenças cardíacas coronarianas (“Toxnet,” 2012). De acordo Schmidt e outros (2011b), o fármaco genfibrozila, derivado do ácido fíbrico, age reduzindo a concentração plasmática de triglicerídeos e colesterol. O genfibrozila já foi descrito em estudos por sua capacidade em bioacumular e diminuir os níveis de testosteronas observados em golfinhos machos.

4.3 Bisfenol A

Na classe dos desreguladores endócrinos estão os polímeros, aditivos e plastificantes que causam interferência nas etapas normais dos hormônios naturais, os quais têm ligação direta com os processos de desenvolvimento e estabilização. Dentre outros produtos químicos, temos o bisfenol A (BPA). Estudos apontam sua capacidade de alterar a atuação dos hormônios na tireóide, estimular o aumento de células cancerígenas de próstata em humanos, dentre outras (FASANO et.al, 2012).

Segundo Encarnação, (2007) as descobertas sobre o potencial estrogênico do bisfenol A não são recentes. Estudos de 1938 já detectaram a estrogenicidade do bisfenol A. Essas pesquisas continuaram até o início da utilização do bisfenol A na fabricação de plástico policarbonato e após em resinas epóxi no revestimento de latas de conservas.

Desse modo, temos o composto bisfenol A produzido por várias indústrias no mundo e o crescimento da população mundial tem contribuído para o aumento de sua demanda, que cresce anualmente. A maior utilização do bisfenol A são em polímeros sintéticos, como as resinas epóxi, usados para envernizar latas de alimentos e em resinas de garrafões e mamadeiras, entre outras utilizações em escala menor (BESERRA, RODRIGUEZ, 2012; FLINT et al, 2012; MAIA et al, 2010).

Diversos autores têm mostrado em seus estudos a migração do bisfenol A, através de recipientes utilizados na conserva de alimentos (CABADO et al, 2008). A presença de bisfenol A, em baixas concentrações no organismo humano durante seu desenvolvimento, pode causar: proliferação de células

cancerígenas, aumento do risco de infertilidade com o bloqueio da síntese de testosterona e indução à puberdade precoce.

4.4 4-nonilfenol (4NF)

O 4-nonilfenol está entre os surfactantes mais utilizados, pois são estabilizadores de plásticos, para limpezas, como monômero na produção de resinas fenólicas e no preparo de fungicidas e lubrificantes, demulsificantes de petróleo, antioxidantes para borracha e plásticos. Essa substância tem sido usada como coestabilizante à quente, misturada com metal na produção de plástico, e é encontrada no ambiente através do descarte de resíduos (VOUTSA, 2006; CALIMAN, 2009; GEENS, 2012; “Toxnet,” 2012)

4.5 4-octilfenol (4OF)

O 4-octilfenol está presente no ambiente em amostras de esgotos, rios, biotas e água potável e chega ao ambiente marinho por águas residuais das fábricas. O 4OF vem da biodegradação de surfactantes alquilfenóis etoxilados, que são usados em larga escala como detergentes, emulsificantes, lubrificantes, fungicidas, bactericidas, adesivos, entre outros. Alguns estudos apontam a presença de 4OF na urina, no leite materno, no sangue do cordão umbilical e em tecidos adiposos de humanos. Outro efeito relatado na literatura é a capacidade do 4OF desregular a resistina, um hormônio do adipócito que pode acarretar uma resistência à insulina e diminuir a diferenciação de adipócitos (LUO, 2010; ASIMAKOPOULOS, 2012; SWEDENBORG et al., 2009; “Toxnet,” 2012).

4.6 Estriol (E3)

O estriol é um hormônio natural vastamente usado em processos de reposição hormonal no período da menopausa, pois o estriol tem a capacidade de normalizar o epitélio vaginal, cervical e uretral, auxiliando na restauração da microflora normal e o pH fisiológico da vagina. O estriol também potencializa a resistência das células em relação a inflamações e infecções. Esse hormônio é sintetizado durante a gravidez em grande escala, podendo ser oriundo do metabolismo do estradiol e estrona; e, dessa forma, menos ativo que estes (RAIMUNDO, 2007; VOOJIS, 1995).

4.7 Estrona (E1)

Estrona é um estrogênio natural e é um subproduto do metabolismo do estradiol que é convertida por hidratação em estriol. Sua utilização está relacionada à reposição hormonal e à prevenção de osteoporose. Estudos apontam que a população pode ingerir estrona através da água contaminada. A presença da estrona foi identificada em plantas, urina de mulheres grávidas, placenta humana, urina de touros e cavalos, etc. (GOODMAN, 2005; GOODMAN GILMAN, 2005 "Toxnet," 2012).

4.8 17 β -estradiol (E2)

O Estradiol (E2) é um hormônio sexual natural, esteróide. Entre suas funções estão o crescimento dos seios, de ossos e características sexuais secundárias; além disso, ainda garante a elasticidade da pele e de vasos sanguíneos, a manutenção dos tecidos, entre outros. (GILMAN).

De acordo com Goodman Gilman (2005), o Estradiol é empregado na menopausa em terapias de reposição hormonal, em tratamento de hipostrogenismo, tratamento de câncer de mama e próstata (Toxnet, 2012). Esse hormônio sofre uma biotransformação no fígado a estrona e estriol (principal hormônio eliminado na urina e nas fezes). O E2 é excretado por animais e sua maior fonte de contaminação vem de criações, as quais não passam por tratamento dos resíduos que assim atingem os corpos d'água (SCHUH et al. 2011).

4.9 17 α -etinilestradiol (EE2)

O Etinilestradiol (EE2) é utilizado em pílulas anticoncepcionais combinadas e em terapias de reposição hormonal e é o principal estrogênio sintético usado para esse propósito. Seu uso é empregado também em tratamentos de carcinomas metastático, mamário masculino e de próstata avançado. É também utilizado em contraceptivo de emergência combinado com levonorgestrel ou norgestrel (pílula do dia seguinte) entre outros (FERREIRA, 2008; "PubChem," 2012).

5. Ecotoxicidade e Sedimentos

Outras análises como as ecotoxicológicas têm contribuído para uma maior precisão nos resultados. O desenvolvimento populacional e tecnológico contribui com uma maior degradação do ambiente. A carga de compostos artificiais que a natureza tem dificuldade em assimilar, pelo nível de concentração de substâncias tóxicas, pode causar diversos efeitos à biota. Esses efeitos podem ser agudos, crônicos, letais e deletérios que alteram o comportamento, inibem a reprodução, provocam anomalia em descendentes, podendo também acarretar aumento populacional em uma espécie e mortalidade em outras ((ARAGÃO & ARAÚJO, 2006).

Os ensaios ecotoxicológicos são importantes, pois consideram vertentes como as interações: bióticas e abióticas, além de medir a biodisponibilidade dos contaminantes no ambiente. As análises realizadas em laboratório vão medir a resposta do organismo escolhido, correlativo em seu meio natural. Dessa forma, o teste de toxicidade é uma ferramenta que dá suporte ao diagnóstico, desde que em limites permitidos de substâncias químicas, cujas concentrações não afetem a biota (BORRELY et al., 2002; CETESB, 2007).

Os monitoramentos ambientais, antes efetuados somente com análises químicas baseadas na quantificação e concentração de poluentes, são importantes, mas não dão conta de toda complexidade das interações de substâncias tóxicas e da biota. De acordo com ARAÚJO et al. (2006) “os contaminantes podem se associar a certas partículas tornando-se prontamente disponíveis para o ecossistema sofrer transformações originando formas mais ou menos tóxicas, ou migrar, via rede trófica, do sedimento para os organismos bentônicos ou para a coluna d’água. Portanto níveis elevados de contaminantes persistentes no sedimento podem ou não acarretar efeitos para a biota aquática, dependendo de uma série de fatores que alteram a biodisponibilidade e a toxicidade dos mesmos” (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

O estudo ecotoxicológico em sedimentos é importante, inclusive pela característica do mesmo em acumular poluentes, tornando-se um testemunho dos impactos sofridos no ambiente durante anos. Para tanto, este trabalho analisou os riscos ambientais pelos quais a Baía de Guanabara vem sofrendo,

mediante a atividade antrópica, industrial e afins no seu entorno (ARAÚJO et al., 2006; ESTEVES,).

A caracterização dos sedimentos foi feita através de levantamento bibliográfico, possibilitando verificar a diferença granulométrica e fontes de contaminação na intercalação com áreas menos poluídas para fins de comparação. No ensaio ecotoxicológico, foi utilizada a bactéria fotoluminescente *Allibrio fischeri*, que é largamente testada e padronizada nacional e internacionalmente.

Alguns efeitos dos Microcontaminantes e suas matrizes são pouco estudados, dessa forma a análise de 14 amostras ambientais da Baía de Guanabara e seus efluentes se tornam importantes na coleta de dados para monitoramento desses corpos hídricos.

6. Saneamento e os impactos no ambiente

O saneamento básico se caracteriza por medidas para promoção da saúde, e, a fim de que isso seja possível, são necessárias medidas de higiene, coleta de lixo e tratamento de água e esgoto. O Brasil assegura o direito ao saneamento básico na constituição. A Lei nacional nº. 11.445/2007 tem como um dos seus pilares a universalização dos serviços de saneamento básico. Desse modo, todos têm direito ao acesso à água potável, ao tratamento de esgoto, à coleta de lixo, ao manejo de resíduos sólidos e das águas pluviais (COSTA; GUILHOTO, 2014).

Embora a lei defina essas diretrizes, os serviços de saneamento básico não chegam a todas as pessoas e lugares, em determinados lugares o acesso ao saneamento é irregular ou até mesmo ausente; esses dados afetam diretamente à população vulnerável, ou seja, aquela cujo nível socioeconômico é baixo (PAZ; ALMEIDA; GUNTHER, 2012). Na Tabela 06, alguns dados sobre a cobertura de esgotos no Estado do Rio de Janeiro.

Tabela 06. Cobertura de esgotos no Estado do Rio de Janeiro

Região	Estado	Número de Municípios	População Urbana (em mil hab.)	População atendida por Coleta de esgoto	População atendida por Tratamento de esgoto	Parcela tratada em relação á coletada
Sudeste	Rio de Janeiro	92	15.922,1	73%	42%	58%

Fonte: Agência Nacional de Águas, ANA (2017).

O saneamento básico é de suma importância para o crescimento do país. Os serviços oferecidos pelo saneamento interferem diretamente na qualidade de vida dos indivíduos, diminuindo os dados da mortalidade infantil, aumentando a arrecadação com o turismo, além disso, eles agregam valor aos imóveis entre outros fatores. Segundo o Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS, 2015) e o estudo do Trata Brasil (2015), os dados sobre a falta de saneamento e enfermidades relacionadas são impactantes:

- **88%** das mortes por diarreia estão associadas à falta de saneamento;
- Mais de **100** milhões de brasileiros não têm acesso a esgoto tratado;
- Mais de **3,5** milhões de brasileiros, nas **100** maiores cidades do país, despejam esgoto irregularmente;
- Mais de **35** milhões de brasileiros não têm acesso à água tratada;
- **Metade** do país não tem coleta de esgotos;
- Somente **42%** dos esgotos gerados são tratados e isso explica a péssima qualidade da água da maior parte de nossos rios, reservatórios, baías.

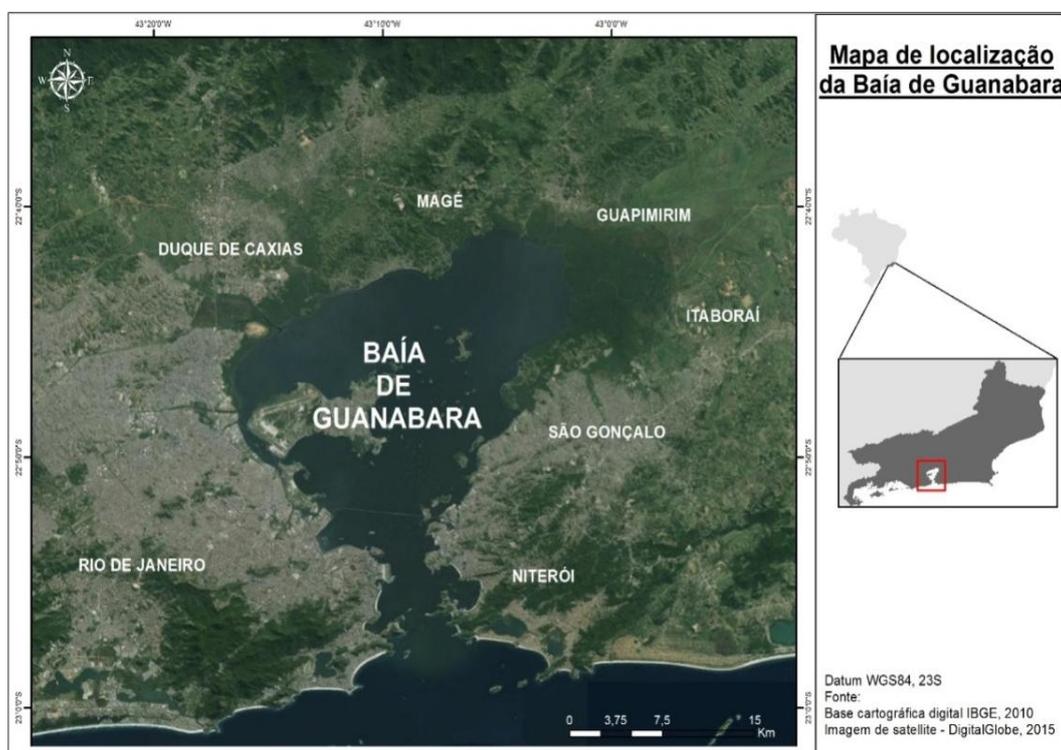
Desse modo, embora existam muitas informações disponíveis sobre saneamento e os impactos da falta do mesmo na população, muitas cidades continuam sem acesso a esses serviços. Assim, a qualidade das águas é afetada constantemente pelo despejo de esgoto doméstico, sendo mais concentrado na zona urbana pelo aumento populacional (ANA, 2015).

7. ÁREA DE ESTUDO

7.1 Baía de Guanabara

A Baía de Guanabara está localizada entre os paralelos 22°24" e 22°57," de latitude sul com 43°33' e 43°19' a oeste no Estado do Rio de Janeiro. Sendo uma das mais importantes baías costeiras do Brasil, a Baía de Guanabara é um estuário de 91 rios e canais circundados pelas cidades de Niterói, São Gonçalo, Duque de Caxias e outras menores, (Baptista Neto et al., 2006). A Baía de Guanabara está dividida em cinco regiões, conforme proposto por Mayr et al., 1989 (apud Lima,1996) levando em consideração suas características hidrológicas. Na figura 05, mapa da localização da Baía de Guanabara.

Figura 05. Mapa da Baía de Guanabara



Fonte: Adaptado de Nascimento, 2016

Segundo AMADOR (1997), os sedimentos da Baía de Guanabara são principalmente arenosos e de lamas sílticas com algumas mudanças conforme a cidade de localização. Os mecanismos de transporte e deposição de

sedimentos acontecem por ação de correntes produzidas por ciclo de marés, ação de ondas e correntes tendo a ação dos ventos uma ação secundária.

Atualmente, a Baía de Guanabara tem sido citada como um dos ambientes mais poluídos do Litoral brasileiro e recebe grandes quantidades de efluentes sanitários, resíduos industriais, urbanos e agrícolas, além de outros poluentes. Embora muito estudada, ainda não se sabe o nível de contaminação da Baía de Guanabara, mas essa situação tem despertado o interesse da comunidade científica por ser um ecossistema de estuário importante para a remoção de materiais suspensos e poluentes (BAPTISTA NETO et al., 2006).

Inserida no centro da segunda Região Metropolitana de maior importância no Brasil, a Baía de Guanabara tem seus corpos hídricos deteriorados. No seu entorno, além dos problemas de poluição, há também a luta por esse território onde se confrontam municípios e política, economia e etc. (Costa, 2015). O crescimento da população aliado à extensão das zonas urbanas, sem medidas apropriadas de esgotamento sanitário, tem provocado a poluição por esgoto doméstico na Baía, além dos efluentes industriais em volumes cada vez maiores, que lançam óleo, metais pesados, substâncias tóxicas e orgânicas na Baía de Guanabara (BRITTO, 2003).

Na atualidade, as indústrias geram maior preocupação sobre a fauna e flora da Baía. Esse fato torna-se mais preocupante ao analisarmos que há décadas a pesca artesanal ainda se destacava na economia do interior da Baía, além dos seus manguezais que propiciam a população vizinha a viver dos caranguejos, siris e mexilhões etc. da Baía. Os pescadores artesanais ainda resistem na Baía de Guanabara e vivem em conflito pela poluição que influencia diretamente em sua subsistência (SEVÁ, 2013).

Nas duas últimas décadas, o litoral do Estado do Rio de Janeiro tem se destacado como umas das regiões petrolíferas mais importantes do Brasil e do mundo. Temos, na região metropolitana do Rio de Janeiro, refinarias, grandes terminais de carga e descarga de produtos petrolíferos e dutovias (SEVÁ, 2013).

Analisar a poluição na Baía, quanto à micropoluentes e toxicidade, torna-se um desafio, porque não há dados disponíveis sobre a relação entre a exposição ambiental aos micropoluentes e seus efeitos adversos na saúde de humanos e de outros organismos. Várias substâncias com potencial de causar

efeitos negativos em seres vivos estão presentes em amostras ambientais, expondo frequentemente os seres humanos e os outros animais. Estudos na Baía de Guanabara são de grande importância para a população do Rio de Janeiro e do Brasil como um todo. Tabela 07 estão descritos os nove pontos de coleta da Baía de Guanabara e na Figura 06 o mapa da Baía de Guanabara.

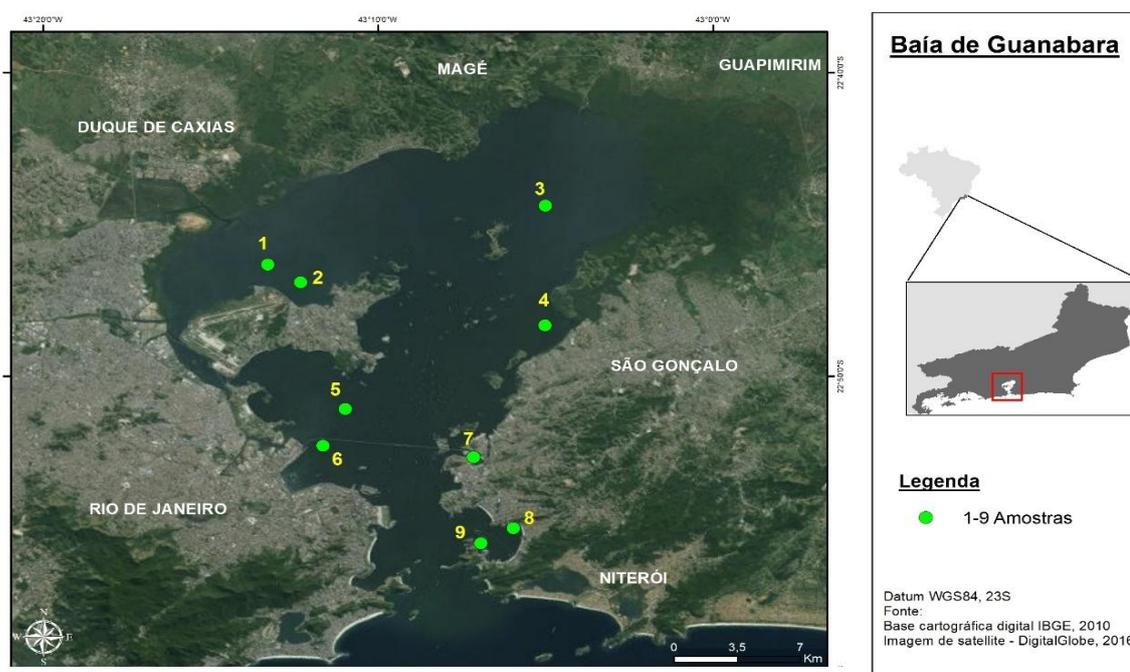
Tabela 07. Pontos de coleta da Baía de Guanabara

Estação	Local	Latitude	Longitude	Temperatura	Salinidade
1	Ilha do Governador	22°46'19"	43°13'17,9"	*	*
2	Ilha do Governador – Sudoeste	22°46'53,9"	43°12'18,6"	25,129 21,493	30,800 34,068
3	Paquetá	22°44'22,7"	43°5'00,1"	25,000 22,700	32,300 33,200
4	São Gonçalo	22°48'19,0"	43°5'1,2"	24,800 24,700	33,000 33,000
5	Fundão	22°51'4,6"	43°10'59,0"	21,294 21,118	33,990 34,054
6	Zona portuária - Rio de Janeiro	22°52'17,3"	43°11'38,4"	22,300 21,000	33,500 34,100
7	Zona portuária - Niterói	22°52'39,9"	43°0,7'9,2"	22,600 21,800	32,500 34,000
8	Enseada de Jurujuba – rio Cachoeiras	22°55'00,3"	43°5'57,6"	22,600 22,400	34,600 34,600
9	Enseada de Jurujuba – barcos de pesca	22°55'30,13"	43°6'55,91"	21,534 18,862	34,621 35,239

(*) Não foi possível computar esses dados no momento da coleta por erro no aparelho.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 06 - Mapa da localização dos pontos coletados na Baía de Guanabara



Fonte: Nascimento, 2016.

7.1 Propriedades da Baía de Guanabara

De acordo com Pritchard (1967) e Burton (1976) um estuário caracteriza-se como um corpo de água costeiro, semi-fechado que se comunica com o mar, onde a água salgada é diluída com água doce proveniente da drenagem continental. As marés, ventos e descargas fluviais definem a circulação e salinidade, deste ambiente (Baptista Neto et al. 2006). Essa divisão entre as águas mais e menos salinas se dá devido a temperatura das águas, consistindo em menos salina próxima aos rios e manguezais na parte norte.

A Baía da Guanabara possui duas regiões, com diferentes tipos de circulação, em sua entrada: perto ao alinhamento da Fortaleza de Santa Cruz e do Forte São João com características de um estuário misturado, neste caso a salinidade é homogênea na coluna d'água verticalmente. Essa propriedade acontece, devido a velocidade das correntes de maré que geram turbulências, decorrentes da batimetria e do estreitamento da entrada da Baía.

As características na altura da ponte Rio – Niterói são diferentes, seus atributos são de um sistema parcialmente misturado, diminuindo a salinidade

seguindo para o interior da Baía. Este processo acontece devido a redução da velocidade das correntes de maré, acarretada pelo alargamento da Baía que se inicia do alinhamento do Forte de Gragoatá – Aeroporto Santos Dumont. Dessa forma, vários fatores interferem na circulação, impedindo que a mesma seja classificada (Kjerfve et. al., 1997).

Os sedimentos da Baía de Guanabara podem ser classificados de acordo com áreas delimitadas, da seguinte forma: Parte Sul: com extensão da entrada da Baía até próximo à ponte Rio – Niterói. Nesta área as areias são de grossa/média até a fina ou muito fina, com pouca matéria orgânica. De acordo com os autores, esta área é de grande dinâmica de correntes para o interior da Baía e predomina influência das ondas e correntes de maré. Em direção as ilhas e ao canal central, esta hidrodinâmica não é tão observada e os sedimentos são mais finos, como, silte e argila. Entre essas regiões chamadas abrigadas estão a Enseada de Jurujuba e a área próxima à ilha das Cobras (AMADOR 1997; CATANZARO, 2002; KJERFVE et al., 1997; QUARESMA et al., 2001).

A parte central é classificada como área de transição, onde ocorrem mistura de sedimentos com granulometrias diferentes, variando de areia grossa/média a argila. A diminuição da granulometria em direção ao interior da Baía é associada a essa transição em que os processos marinhos, serão influenciados por sedimentação fluvial, conforme descrevem Kjerfve et al. (1997); Quaresma et al. (2001). Na parte Norte, área mais interna da Baía, abrange desde a Ilha do Governador que abriga ação das ondas e correntes de maré, caracterizando-se como um ambiente de baixa energia. Seus sedimentos são muito finos variando de silte a argila e maiores índices de matéria orgânica. Sofre influências fluviais, auxiliando a deposição devido as águas calmas. Ficam fora desta dinâmica, as áreas isoladas como o entorno da Ilha de Paquetá, onde ocorrem as correntes de fundo (ALMEIDA, 1976; JICA, 1994; OLIVEIRA, 1996; AMADOR, 1997).

A Baía de Guanabara é um ecossistema de grande importância, com uma dinâmica que interfere diretamente no tipo de sedimento e poluentes. Desse modo, detectar e quantificar a presença de micropoluentes neste ambiente estuarino tão complexo é um enorme desafio, demandado mais

estudos interdisciplinares e multidisciplinares para melhor compreensão deste corpo hídrico.

7.2 Canal do Mangue

O canal do Mangue data do período imperial, quando era um grande manguezal composto por vários rios e sua localização impedia uma maior circulação entre as regiões, por causa do odor e da proliferação de vetores que transmitiam doenças. Dessa forma, o império construiu um canal e o chamou de Canal do Mangue; esse canal receberia as águas dos rios e das chuvas e essas escoariam na Baía de Guanabara. Hoje a bacia do Canal do Mangue passa por problemas, destacando-se as inundações no verão, devido ao crescimento da região, o qual ocasionou também a poluição dos rios que recebem esgotos sem tratamento adequado.

De acordo com o Instituto Municipal de Urbanismo Pereira Passos (IPP), a sub-bacia do Canal do Mangue se estende por uma área de 45,43 km², até seus limites pela sub-bacia do Canal do Cunha, pela Baía da Guanabara e pelo Maciço da Tijuca. Os principais rios da sub-bacia do Canal do Mangue e suas respectivas extensões são: o Rio Maracanã com 10,1 quilômetros, Rio Joana com 5,5 quilômetros, Rio Trapicheiros com 5,2 quilômetros, Rio Comprido com 4,5 quilômetros e Rio Papa Couve com 3,0 quilômetros.

Nos dados do Instituto Pereira Passos (2005), consta que a sub-bacia está situada nas Zonas Centro e Norte, dentro do município do Rio de Janeiro (RJ). Os bairros que fazem parte de toda sub-bacia são: Centro, Santo Cristo, Catumbi, Estácio, Cidade Nova, Rio Comprido, Maracanã, Praça da Bandeira, Vila Isabel, Andaraí, Grajaú, Tijuca, Muda, Usina e Alto da Boa Vista. A sub-bacia do Canal do Mangue faz parte da Macrobacia da Baía de Guanabara, que abrange outras sub-bacias, tanto na cidade do Rio de Janeiro, como em municípios da baixada fluminense e Niterói.

Nesta pesquisa, foram coletados sedimentos ao longo do Canal do Mangue, começando no Alto da Boa Vista, onde se julgava áreas mais preservadas até ao longo do Rio Maracanã. Devido aos rios da bacia do Canal do Mangue serem em sua maioria canalizados, a coleta de sedimentos foi mais difícil por causa do pouco aporte de sedimentos em períodos sem chuva.

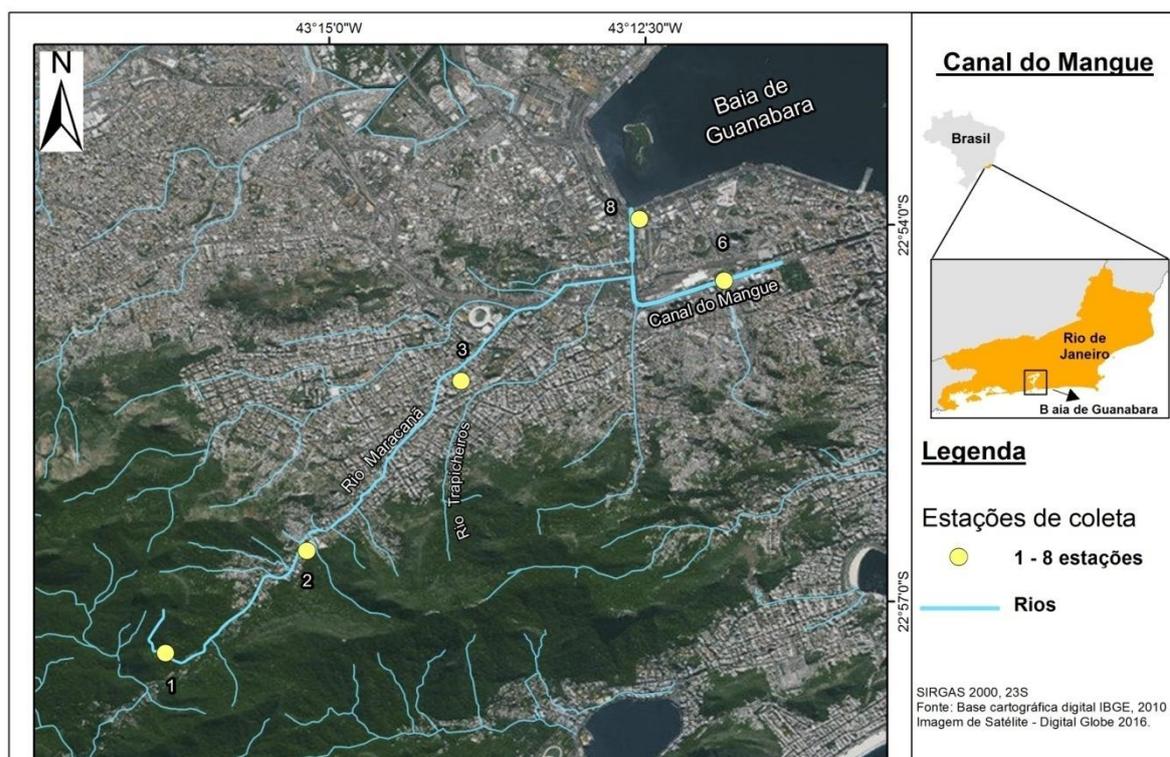
Desse modo, coletamos os sedimentos em 5 pontos, como é apresentado na Figura 07 e na Tabela 08 a descrição dos pontos.

Tabela 08 - Coordenadas dos 05 pontos de coleta sedimento do Canal do Mangue e Rio Maracanã

Estação	Local	Latitude	Longitude
SED 1	Alto da Boa Vista – Acima da CEDAE	22°57' 71.4" S	43°16'46.1" W
SED 2	Rua Conde de Bonfim	22°56'35.8" S	43°14' 70.4" W
SED 3	Estádio do Maracanã	22°56'33.1" S	43°14'91.3" W
SED 6	Av. Presidente Vargas- próximo a Prefeitura	22°54'49.7" S	43°13'33.7" W
SED 8	Rodoviária Novo Rio	22°54'49.7" S	43°13'33.7" W

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 07- Mapa do Canal do Mangue



Fonte: Arquivo pessoal

7.3 Breve histórico de Jurujuba e praias Adão e Eva

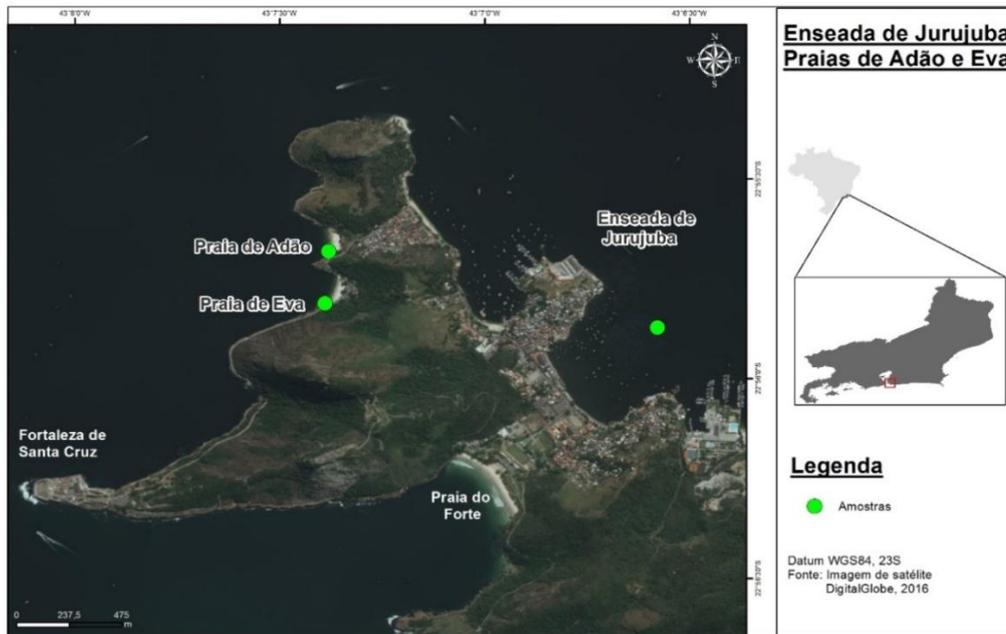
O bairro de Jurujuba está situado a Leste da Baía de Guanabara. É caracterizado por uma península circundada por águas oceânicas e da baía. Faz limite continental com Charitas, próximo ao cruzamento entre Avenida Carlos Ermelindo Marins, e o caminho para o Forte Imbuí; e com Piratininga, pela linha de cumeada do Morro do Ourives. A população estimada de acordo com IBGE (2010) é de 2.797 habitantes. A área de Jurujuba é formada principalmente por morros, variando de altitude entre 39m (Morro do Lazareto) a 263m (Morro do Macaco). Algumas dessas elevações se ampliam até a orla, na maioria das vezes em forma de escarpas rochosas, as quais acabam no mar, intercaladas de pequenas enseadas e praias. Duas dessas praias são as de Adão e Eva, praias gêmeas localizadas próximas a Jurujuba, suas extensões são de respectivamente 250 metros e 150 metros. Suas águas são frias e de coloração esverdeada e as areias brancas e finas. A Praia do Adão situa-se bem próxima à Praia da Eva, na entrada da Baía de Guanabara. A direita da praia da Eva tem o Morro do Morcego, que separa as praias. O acesso à praia é realizado por meio de uma escadaria.

A ocupação de Jurujuba aconteceu no período colonial com a distribuição de terras e sesmarias. No início, correu a extração de madeiras, porém a topografia e a localização de Jurujuba contribuíram para que a atividade pesqueira se destacasse nessa função, além do estabelecimento de uma colônia de pescadores e criação de um sistema de defesa para proteção da entrada da Baía de Guanabara dos invasores a partir do séc. XVI. Desse modo, esses sistemas utilizados para defesa integram a Fortaleza de Santa Cruz e os Fortes Rio Branco, Imbuí e São Luís, conhecido também como Forte do Pico, por sua localização estar em um platô na parte superior do Morro do Pico.

Após um período em que ocorreu a invasão e expulsão dos franceses, os portugueses ocuparam o território e implementaram obras e modificações; nesse contexto, foi aberta em uma rocha granítica a Estrada General Eurico Gaspar Dutra em 1943, possibilitando a entrada de veículos por Jurujuba. Com a expansão do bairro, vieram as atividades pesqueiras, bares, restaurantes e outros tipos de comércios e afins que intensificaram o crescimento da

população e deram lugar à favelização, observada nas últimas décadas por Niterói - Bairros (1991) e pela Secretaria Municipal de Ciência e Tecnologia (1999). Na figura Figura 08, mapa da Enseada de Jurujuba.

Figura 08. Mapa da Enseada de Jurujuba e Praias Adão e Eva



Fonte: Nascimento, 2016

8. MATERIAIS E MÉTODOS

A partir das amostras coletadas, foi realizado um ensaio de ecotoxicidade, utilizando como organismo-teste a bactéria *Aliivibrio fischeri*. A avaliação da citotoxicidade ocorreu como descrito por Frische e outros (2009). Foi efetuada também a determinação da atividade estrogênica, realizada pelo ensaio *in vitro* Yeast Estrogen Screen (YES), com uma levedura de *Saccharomyces cerevisiae* modificada de acordo com Routledge e Sumpter (1996). As amostras também foram utilizadas para a detecção e quantificação dos microcontaminantes, 4-nonilfenol, 4-octilfenol, Bisfenol A, Ibuprofeno, Diclofenaco, Naproxeno, Paracetamol, Genfibrozila, Estrona, 17 β -estradiol, 17 α -etiniestradiol, Estriol e alguns micropoluentes por CLAE/FLU e outros por CG/MS.

8.1 Postos de amostragens e metodologia das coletas

Foram realizadas duas coletas utilizando um barco no período da manhã com extensão até o final da tarde. A primeira coleta de sedimentos foi realizada no verão de 2013 no Rio Maracanã e Canal do Manguê. A segunda coleta ocorreu no verão de 2014 na Baía de Guanabara e a terceira coleta no inverno de 2015.

8.2 Preparo das amostras para o ensaio *in vitro* YES e Cromatografia

8.2.1 Lavagem e armazenamento das vidrarias

As análises das amostras começam pela etapa da lavagem da vidraria, já que todo cuidado é necessário devido às baixas concentrações de micropoluentes no ambiente. Dessa forma, é preciso eliminar ao máximo o risco de contaminação. Todos os solventes possuem grau de pureza (HPLC) e são da marca Merck. O processo de lavagem e armazenamento da vidraria será descrito na figura 09 a seguir.

Figura 09. Processo de lavagem e armazenamento da vidraria

Lavagem da vidraria

Lavar com água potável abundantemente

Deixar de molho 24hs em solução Extran 10% (Merck)

Enxaguar com água potável no mínimo 10 vezes

Rinsar com Hexanograu (HPLC, Tedia®)

Enxaguar no mínimo 5 vezes com água Milli-Q

Rinsar com Etanol grau (HPLC, Tedia®)

Enxaguar 3 vezes com água ultrapura Milli-Q

Após a descontaminação e secagem as vidrarias foram guardadas envolvidas em papel alumínio

8.3 Coleta e acondicionamento das amostras

As amostras de sedimentos foram coletadas em frasco de vidro âmbar. Nos sedimentos coletados, tanto no Canal do Mangue, quanto na Baía de Guanabara, houve o auxílio da draga Van Veen.

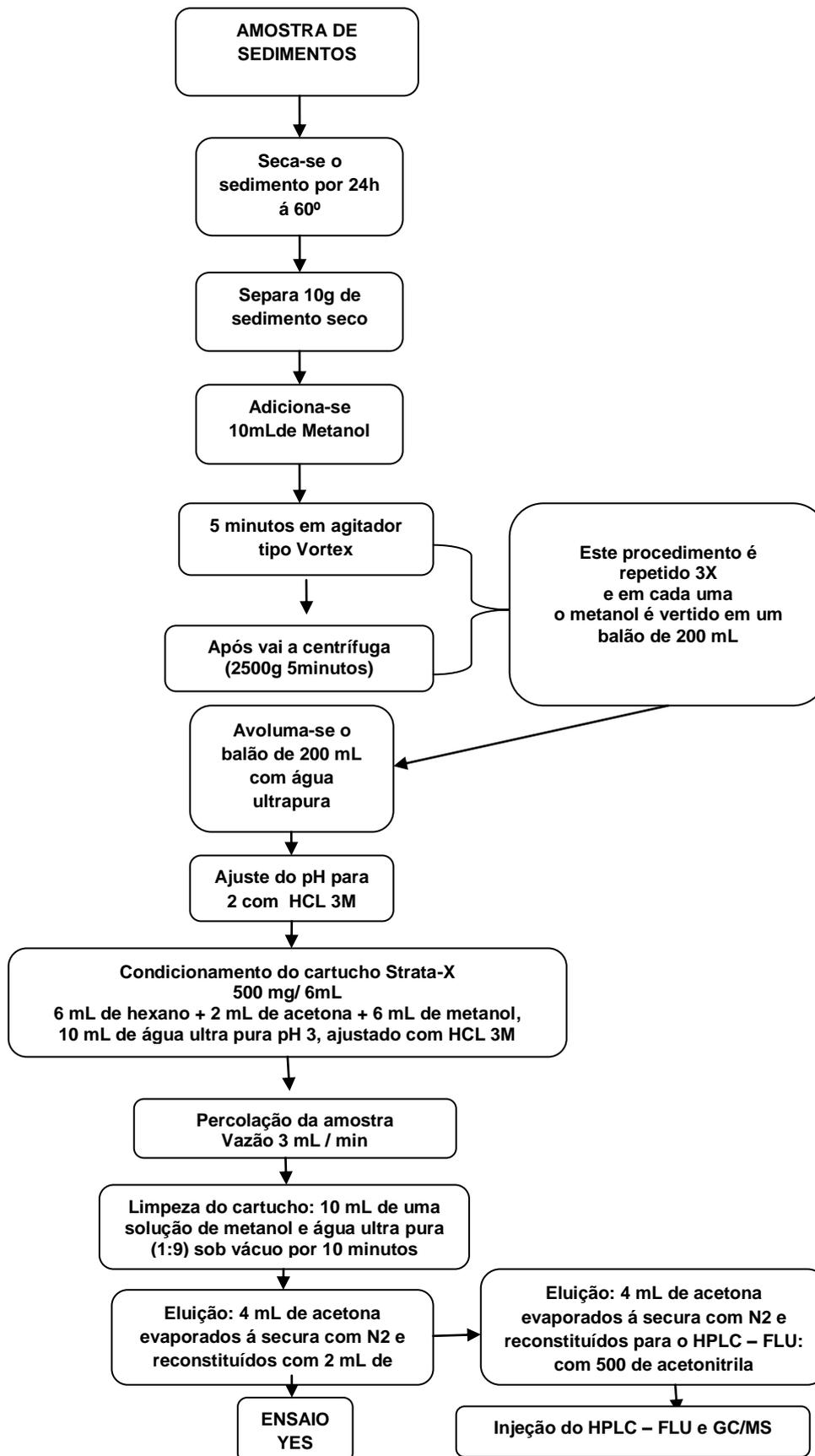
Os frascos foram armazenados em isopor com gelo, transportados até o laboratório de Engenharia Sanitária (LES) e mantidos à temperatura inferior a 6 °C, para futura realização das análises. A seguir a Figura 10 da draga Van Veen, dos frascos âmbar e isopor utilizados nos campos.

Figura10. Draga Van Veen e material de apoio



As amostras foram preparadas após ficarem fora da geladeira por aproximadamente duas horas antes do início do processo para atingirem a temperatura ambiente. A Figura 11 apresenta um fluxograma no qual está detalhado o procedimento de preparo das amostras para o ensaio YES e CLAE.

Figura 11. Fluxograma do preparo das amostras de sedimento do ensaio YES



8.4 Preparo das amostras

O processo de preparo dos sedimentos requer uma etapa que passa o sedimento para o meio líquido para retirada dos compostos de interesse retidos. Na primeira etapa, o sedimento foi seco por 24h na estufa a 60°C, logo após foi pesado 10 gramas e colocado em um tubo de vidro, no qual foram adicionados 10 mL de metanol. Esse material passa por um agitador vortex por 5 minutos e, na sequência, foi para a centrífuga a 2500g por 5 minutos, depois se fez transferência do volume líquido para um balão. Com esse procedimento, os compostos de interesse ficam retidos no metanol. Essa etapa é repetida três vezes, totalizando 30 mL de metanol, que no final é avolumado com água ultrapura para 200 mL. Com o processo finalizado, o pH foi ajustado para 2, e iniciada a extração em fase sólida.

8.4.1 Extração em fase sólida (EPS)

Para a etapa da EFS empregou-se a metodologia descrita por Cordeiro (2009). Assim, foi utilizado para extração o Manifold (Agilent (VacElut 12)), na capela, sendo um cartucho para cada amostra. Utilizou-se o cartucho Strata-X (Phenomenex®) de 500 mg / 6 mL. Os mesmos foram condicionados com 6 mL de hexano, 2 mL de acetona, 6 mL de metanol (grau HPLC, Tedia®) e 10 mL de água ultrapura com pH ajustado para 3, com solução de HCl 3M. A percolação no cartucho ocorreu sob vácuo, com vazão de aproximadamente 3 mL/min. Nessa etapa, é preciso atenção para que a parte sólida do cartucho não seque, este procedimento evita a perda de analitos.

8.4.2 Clean up dos cartuchos e reconstituição dos analitos

O *clean up* das amostras se caracteriza na lavagem do cartucho para remoção dos interferentes. Utilizou-se 10 mL de uma solução de metanol e água ultrapura na proporção de (1:9), e processo foi feito mantido a vácuo por 10 minutos para remoção do excesso de água. Após isso, os cartuchos foram para o freezer a -20°C, aguardando a eluição.

A eluição foi realizada com 4 mL de acetona (grau HPLC, Tedia®), sob efeito da gravidade, acondicionados em frascos de vidro de 10 mL. Para isso foi utilizado o sistema Manifold sem o vácuo. Para secar os cartuchos, a bomba

de vácuo foi ligada por 5 minutos e os extratos das amostras evaporados. A reconstituição foi efetuada com 2 mL de etanol (grau HPLC, Tedia®), para o ensaio YES e com 500 µL de acetonitrila (grau HPLC, Tedia®), para a cromatografia. Com o término dessa etapa, as análises são iniciadas.

8.5 Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE/FLU) com detector de Fluorescência.

As análises cromatográficas foram realizadas para quantificação dos microcontaminantes. O método utilizado foi por cromatografia líquida de alta eficiência em um cromatógrafo fabricado pela Waters Corporation®, que utiliza um detector de fluorescência com comprimentos de onda de emissão a 306 nm e excitação a 280 nm.

As análises com fluxo de 1 mL/min de fase móvel, modo gradiente variando a percentagem de acetonitrila (ACN) e água ultrapura, iniciando com 40% de ACN, mudando para 50 % em 6 minutos, 30 % em 9 minutos. As fases móveis utilizadas (ACN e água ultra pura) possuem alto grau de pureza e estão livres de oxigênio e outros gases dissolvidos.

Para a detecção e quantificação dos microcontaminantes em sedimentos, as condições cromatográficas foram de uma fase móvel de 60% de acetonitrila e 40% de água ultrapura, um volume de injeção do extrato de 20 µL, modo de injeção do extrato com preenchimento parcial do “loop” do amostrador.

A vazão do eluente foi de 1 mL min⁻¹, a excitação foi de 223 nm e a de emissão foi de 300 nm. A fase estacionária foi composta por uma coluna cromatográfica da Novapak PAH (4,6 x 250mm, 5 micras), que permaneceu em uma temperatura de 40° C ± 1 durante todo o tempo da análise de 8 min no modo de operação isocrático. Para o BPA, a faixa de concentração foi de 125 – 1000.

Foram utilizadas duas curvas de calibração preparadas pela injeção de um padrão, contendo aproximadamente 500 µg/L (ppb) e 50 mg/L (ppm), e pela modificação do volume de injeção foram determinadas as concentrações. Para as análises, foi utilizada a Novapak PAH (4,6 x 250mm, 5 micras), como coluna cromatográfica, à temperatura de 30 °C com auxílio do forno de colunas.

Foi injetado o volume de 20 µL e repetido 3 vezes para cada amostra, e a temperatura do mostrador foi de 18°C com a finalidade de evitar degradações das amostras durante as análises. Antes de serem injetadas, as amostras foram previamente filtradas, com auxílio de seringas de vidro, em discos de membranas de polivinilideno fluorídrico (PVDF) com 0,22 µm de diâmetro de poro da marca Millex® modelo GV, Limites de Detecção, Quantificação e Linearidade para o composto BFA.

Para validação do método, foi utilizado o guia sobre validação de métodos analíticos, fornecido pelo INMETRO (2010), que analisa os limites de detecção (LD) e os limites de quantificação (LQ), linearidade e recuperação, para os estrogênios. Segundo o guia, a linearidade foi determinada em função da curva padrão avaliando os valores de R e R². O LQ foi obtido pela menor concentração da curva analítica e o LD foi obtido segundo a Equação 1, sendo DP o desvio padrão referente às três injeções do branco (padrão com a menor condição aceitável do analito).

$$LD = DP \times 6,965$$

Equação 1

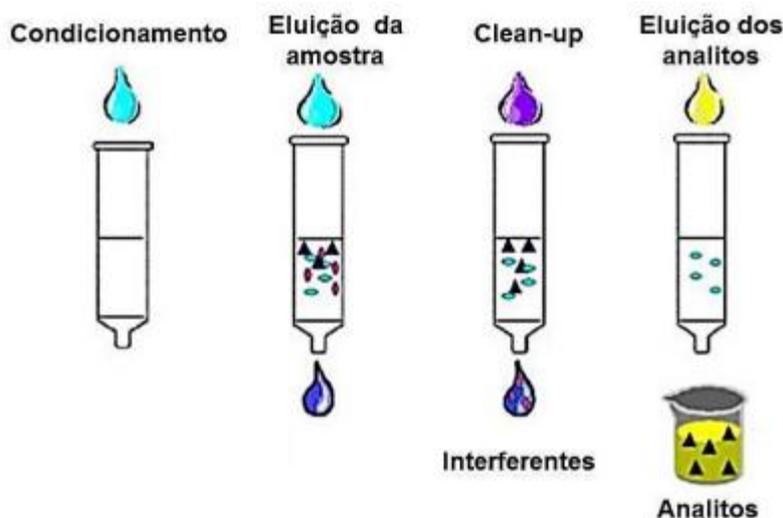
8.6 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

De acordo com a definição da International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), a cromatografia é identificada como “um método físico de separação em que os componentes a serem separados se distribuem entre duas fases, uma delas é fixa (fase estacionária) enquanto a outra (fase móvel) se move em uma direção definida” (IUPAC GOLDBOOK). A cromatografia tem a capacidade de conduzir elementos de uma amostra complexa por meio da fase estacionária através da força da fase móvel, podendo ser um gás, um líquido ou um fluido. Essas fases dividem os métodos cromatográficos basicamente em cromatografia líquida, cromatografia gasosa e cromatografia de fluido supercrítico (SKOOG et al., 2006; SILVA, COLLINS, 2011, HELTMANN, 1983).

A cromatografia gasosa utilizada neste estudo é muito utilizada por sua técnica de separação de compostos voláteis, empregada para análises de compostos orgânicos e inorgânicos. Com a cromatografia, é possível a separação dos componentes, mas necessita dos detectores para a sua

determinação (MCNAIR; MILLER, 2009). A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) contribuiu com diversos campos da pesquisa em química analítica em áreas com amostras muitas vezes complexas como a ambiental (HUBSCHMANN, 2009; SPARKMAN et al., 2011). Na Figura 12 o esquema do processo de extração.

Figura12. Esquema das etapas do processo de extração em fase sólida.



Adaptado de <http://www.crawfordscientific.com>

As fases estacionárias usadas para os microcontaminantes são: C18, HLB (Waters®), Strata-X (Phenomenex®), LiChrolut (Merck®) (MOL et al., 2000; WEIGEL et al., 2004; HERNANDO et al., 2004; U.S. EPA, 2007a; BIZKARGUENAGA et al., 2012). A metodologia para utilização do GC-MS na determinação de desreguladores endócrinos em água e sedimento foi otimizada por Ibaraki e colaboradores (1999); com o processo de extração em fase sólida (SPE), foram encontrados limites de detecção de 0,005 a 0,01 mg/L para amostras de água e 0,3 a 0,5 mg/g para as amostras de sedimento. Além do GC-MS, temos o método de extração líquido-líquido utilizado também neste estudo, o qual foi iniciado pela EPA para análise de hormônios em amostras ambientais (U.S. EPA, 2007b). Para este trabalho, utilizamos o SPE para extração de microcontaminantes em sedimentos.

8.6.1 Derivatização

Alguns compostos estudados possuem uma alta temperatura de ebulição, devido aos seus grupos funcionais polares. Dessa forma, para a análise por GC-MS aumentaria o peso molecular e reduziria a polaridade dos compostos estudados que se adequariam a temperatura da coluna. Assim, o processo de derivatização é necessário. Com a derivatização o composto é modificado se transformando em outro para aperfeiçoar o perfil cromatográfico, reduzindo a polaridade e aumentando a estabilidade térmica e volatilidade, este processo também evita a perda de analitos seja por adsorção à coluna ou decomposição térmica (STALIKAS; FIAMEGOS, 2008; LUO et al., 2010; HUANG, B. et al., 2011).

Diversos reagentes são utilizados para estas reações como: Pentafluorobenzil, N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) ou N-(terc-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA), igualmente são usados os catalisadores trimetilclorosilano (TMCS) e trimetilsilil-imidazol (TMSI), com a finalidade de aumentar a eficiência da derivatização (HERNANDO et al., 2004; HUANG, B. et al., 2011). Desse modo, cada passo do processo é muito importante e as etapas de análises dos microcontaminantes desse trabalho para o GC-MS foram à amostragem, preservação e estocagem, filtração, isolamento do analito e pré-concentração por SPE, derivatização e determinação. Para quantificação dos compostos para minimizar os erros é imprescindível o rigor em todas as etapas do processo, devido a baixa concentração dos analitos nas amostras ambientais que são de ($\mu\text{g/L}$ a ng/L), (MOREIRA, D. S., 2008).

A otimização do processo de derivatização consistia em adicionar a um vial com inserto 100 μL do extrato ressuspendido ou do volume adequado de solução padrão dos analitos; com este volume seco sob fluxo de N_2 adicionava-se 25 μL de piridina contendo 200 ppb do PI (padrão interno) para ressuspender a amostra, após 75 μL do derivatizante (BSTFA: 1 % TMCS) era adicionado. O vial era agitado manualmente e levado à estufa por 30 minutos à 80 °C. Após o vial era retirado da estufa e o tempo de reação estava terminado e a amostra pronta para análise por GC-MS. Alguns contaminantes que não sofrem derivatização possuem ponto de ebulição compatível com o GC/MS). A

seletividade do método ficou de acordo com tempo de retenção e a relação entre os íons selecionados. Na Tabela 09, estão identificados o produto da derivatização.

Tabela 09. Dados sobre o produto da derivatização dos analitos

ANALITO	PRODUTO DA DERIVATIZAÇÃO
Ibuprofeno	IBU-TMS
Paracetamol	PCT-di-TMS
4- Octilfenol	4OF-TMS
4- Nonifenol deuterado	4-NF deuterado-TMS
Genfibrozila	GEN-TMS
Naproxeno	NPX-TMS
Bisfenol A	BFA-di-TMS
Diclofenaco	DCF-TMS
Estrona	E1-TMS
17 β Estradiol	E2-di-TMS
17 α Etinestradiol	EE2-di-TMS
Estriol	

As condições de análise tanto do cromatógrafo e do detector foram otimizadas, o gás de arraste (He) foi fixado, o volume de injeção em 1 μ L e a energia da fonte de ionização em 70 eV. As faixas testadas para as outras variáveis para a otimização estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10 – Valores da otimização das condições de GC/MS para separação e determinação dos microcontaminantes.

PARÂMETROS	VALORES
Modo de injeção	<i>Split e splitless</i>
Razão de <i>split</i> (divisão do fluxo da FM)	1: 20 e 1: 50
Temperatura do injetor	280°C - 330°C
Programa de temperatura do forno da coluna	Temperatura inicial em 60°C ou 100°C mantendo por 1 min e aumentando para 200°C ou 240°C a 10°C/min ou 15°C/min, aumentando para 260°C ou 400°C a 15°C/min ou 30°C/min (entre 1 a 8 min), aumentando a 275°C ou 430°C com rampa de 3°C/min
Temperatura de interface	280°C - 330°C
Voltagem do detector	0,8 a 1,2Kv

Fonte: Sanson, 2012

Os testes foram realizados injetando-se solução padrão dos analitos (concentração de 200 ppb) após a etapa da reação de derivatização otimizada, efetuando os acertos considerando a resolução cromatográfica. Inicialmente foi feita uma corrida cromatográfica para otimização com base nos valores mínimos e máximos de temperatura até o limite suportável pela coluna, com uma taxa de aquecimento lenta (10 °C/min), para conferir o tempo de retenção e temperatura em que cada um dos 11 analitos era detectado. Na próxima etapa foram efetuados ajustes para diminuir o tempo da corrida sem prejudicar a resolução cromatográfica. Esses ajustes são com a finalidade de obter picos satisfatórios e melhorar a resolução.

A identificação dos microcontaminantes nas soluções foi feita inicialmente pelo tempo de retenção, após por comparação dos espectros obtidos com a biblioteca do National Institute of Standards and Technology (NIST Mass Spectral Library®, versão 2.0 d) do equipamento, foram confirmados. O analito encontrado nas amostras só foi quantificado quando a

relação de abundância entre os três íons fosse compatível com a obtida no espectro do padrão do mesmo (com desvio de $\pm 30\%$). Para otimização das condições cromatográficas e de detecção foram necessárias alterações, pois as condições utilizadas no laboratório da UFOP foram satisfatórias produzindo excelentes resultados. Os parâmetros do método cromatográfico otimizado para a determinação dos microcontaminantes deste estudo por CG/MS estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Parâmetros do Método Cromatográfico Otimizado

PARÂMETRO	VALOR
CROMATÓGRAFO A GÁS	
INJETOR	
Temperatura do injetor	280°C
Modo de injeção	<i>Splitless</i>
Tempo de aquisição de amostra no injetor	1,0 min
FORNO DA COLUNA	
Coluna	Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm)
Rampa de temperatura	100°C (1 min), aumento para 200°C a 10°C/min, aumento para 260°C a 15°C, aumento para 280°C a 3°C por min (1min)
FASE MÓVEL	
Gás de arraste	Hélio
Modo de controle da vazão	Velocidade linear
Pressão	~109,6 kPa
Vazão total	40,7mL/min
Vazão na coluna	1,46mL/min
Velocidade linear	45,0cm/s
Razão de divisão	20

ESPECTRÔMETRO DE MASSAS	
Fonte de ionização	250°C
Interface	280°C
Tempo de corte do solvente	5,5 min
Voltagem do detector	0,98 Kv
Tempo total de análise	22,67 min

Fonte: Sanson,2012

8.6.2 Validação da Metodologia

Toda metodologia otimizada para determinar os microcontaminantes, antes de ser utilizada precisa ser validado, garantindo assim a confiabilidade do método. Temos dois tipos de validação: validação no laboratório (in house validation) este tipo é desempenhado dentro de um único laboratório e temos a validação completa (full validation) onde é realizado um estudo interlaboratorial (RIBANI et al., 2004). Para a validação em laboratório, a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) produziu um guia chamado Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (THOMPSON, M. et al., 2002), este guia foi utilizado para a validação do método proposto neste trabalho.

De acordo com o guia da IUPAC, a validação é aplicada para um protocolo específico, para um método de determinação de um ou mais analitos específicos, em uma faixa de concentração conhecida, com uma matriz determinada, possuindo um objetivo particular (THOMPSON et al., 2002). Assim, o método validado gera dados com confiabilidade estatística para uma específica amostra, analito e faixa selecionada. A IUPAC determina que “a dispersão dos resultados aumenta com a concentração dos analitos e a recuperação pode se diferenciar substancialmente nas concentrações altas e baixas”. Assim, o método vai variar de acordo com a concentração dos analitos.

Analisando todos os dados foi possível determinar o LD e LQ das amostras. Para o limite detecção foi estabelecido um cálculo da relação

sinal/ruído. Desse modo, foram feitas diluições dos padrões até nível da concentração estimada para confirmar o LD e LQ do equipamento. O LD foi a menor concentração em que o sinal do analito fosse três vezes maior que o ruído da linha de base. O limite de quantificação foi considerado como a menor concentração em que o sinal analítico fosse dez vezes maior que o ruído. Temos na Tabela 12- os valores de LD e LQ para os microcontaminantes estudados.

Tabela 12- Valores dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) dos microcontaminantes.

ANALITO	LD (ppb)	LQ (ppb)
Ibuprofeno	1,0	2,5
Paracetamol	1,0	2,5
4- Octilfenol	0,5	2,5
4- Nonifenol	0,5	2,5
Genfibrozila	2,5	5,0
Naproxeno	0,5	10,0
Bisfenol A	0,5	25,0
Diclofenaco	5,0	10,0
Estrona	2,5	10,0
17 β Estradiol	5,0	10,0
17 α Etiniestradiol	5,0	10,0
Estriol		

Fonte: Adaptado de Sanson,2012

Os microcontaminantes foram analisados no laboratório do DEAMB – Departamento de Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) por cromatografia à gás com detecção por espectrometria de massas (GC-MS) no equipamento GCMS-QP2010 plus, (Shimadzu®).

8.7 Toxicidade

8.7.1 Ensaio de Toxicidade aguda - organismo-teste *Allivibrio fischeri*

Para o ensaio de toxicidade com o organismo-teste *Allivibrio fischeri*, foram utilizados o sistema Microtox (SDI, modelo 500 analyser) e um fotômetro de precisão desenvolvido para realização deste bioensaio. A metodologia foi descrita segundo NBR 15411-3 (ABNT, 2012) para cepa da bactéria liofilizada. O organismo-teste *Allivibrio fischeri* é uma bactéria marinha que emite luz naturalmente.

A metodologia para este ensaio foi efetuada com uma quantidade de amostra exposta às bactérias bioluminescentes, que emitem luminosidade de acordo com as suas reações. O efeito observado é dado em 30 minutos, período em que se observa uma redução na emissão de luz, apontando a quantidade de organismos que podem estar sendo afetados pela toxicidade da amostra.

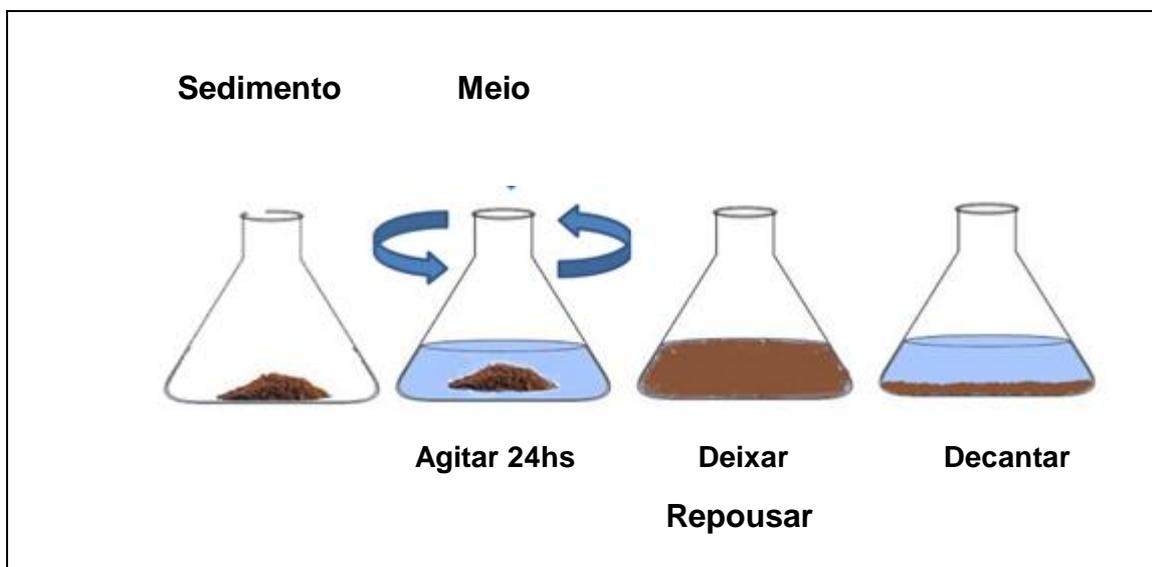
As amostras foram diluídas serialmente em solução de NaCl 3,5% e 900 µL de cada diluição foi adicionado 10 µL da solução de bactéria diluída em cubetas de borossilicato. Inicialmente, foi lida a luminescência dos 10 µL da bactéria pura em cada uma das cubetas. Na próxima etapa, a transferência dos 900 µL de amostra, as cubetas, foram homogeneizadas e mantidas sob incubação a 15°C durante 30 minutos. Foram realizados um controle positivo (branco) com NaCl 3,5% e 5 diluições em duplicatas para cada amostra.

Após o tempo determinado para o contato, foi realizada a leitura da fração emitida de luz pela bactéria e os valores obtidos foram inseridos no programa MICROTOX OMNI 4.1 para efetuar o cálculo, através do método estatístico, da concentração de efeito em 50% dos organismos-teste (CE₅₀).

Utilizou-se uma metodologia de extração adaptada de Ghirardini e outros (2009), na qual 10 g de sedimento seco na estufa a 60^o C foi ressuspenso com 100 ml de solução diluente (NaCl 35% preparado em água destilada) e foi efetuado o elutriado com proporção de 1:4 deixados sob agitação orbital (QUIMIS, modelo 225.11) a 200 rpm por 24 horas. O sobrenadante foi separado para análise, após repouso de 1 hora. O ensaio foi reproduzido e

adicionado 0,02 g de EDTA em 10 mL da amostra, a fim de remover a interferência dos metais. Na Figura 13, um esquema do preparo do elutriado.

Figura 13. Esquema de preparo do elutriado



Os resultados foram analisados de acordo com a faixa de toxicidade descrita por Bulich (1982), descrita na Figura 13, que representa o grau de classificação tóxico da amostra.

Tabela 13. Escala de Grau de toxicidade adotada por Bulich (1982)

Grau de Toxicidade	
CE ₅₀ - % _{v/v}	Classificação
<25	Muito tóxica
25 – 50	Tóxica
51 – 75	Moderadamente tóxica
>75	Levemente Tóxica

8.8 Ensaio *in vitro* YES

8.8.1 Reagentes

Os reagentes utilizados foram da Sigma-Aldrich®. Sulfato de amônio, sulfato de magnésio, sulfato de ferro, fosfato de potássio monobásico, hidróxido de potássio, adenina, ácido glutâmico, L-leucina, L-histidina, L-arginina-HCL, L-metionina, L-tirosina, L-iso-leucina, L-lisina-HCl, L-fenilalanina, L-valina, L-serina, glicose, ácido L-aspartico, L-treonina, sulfato de cobre (II), tiamina, piridoxina, pantetonato de cálcio, inositol, biotina e CPRG.

8.8.2 Preparo das soluções

Para o preparo das soluções foi utilizado o protocolo desenvolvido por Routledge e Sumpter (1996), com modificações feitas por Bila (2005). Esta etapa é feita com vidraria separada somente para este fim, para evitar possíveis contaminações que podem alterar a resposta do ensaio YES acusando falsos positivos. Os reagentes foram pesados em Becker de 50 mL e as soluções só foram abertas na capela de fluxo laminar. As soluções preparadas foram: CPRG e Meio de Cultivo, Meio Mínimo, Glicose, Ácido L-aspartico, L-treonina, Sulfato de Cobre, Vitamina.

Solução de CPRG (Clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosida)

A solução de Solução de CPRG (Clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosida) foi realizada empregando a concentração de 10 mgmL⁻¹ com água ultra pura e guardada em frascos de vidro âmbar estéreis.

Meio de Cultivo

Foram utilizados 5 mL de solução de glucose; 1,25 mL de solução de ácido L-aspartico; 0,5 mL de solução de vitamina; 0,4 mL de solução de L-treonina; 125 μ L de solução de sulfato de cobre (II); 45 mL de meio mínimo

No meio mínimo, as soluções de glicose, ácido L-aspartico e L-treonina foram esterilizadas em frascos de vidro em autoclave a 121°C por 15 minutos. A solução de sulfato de cobre (II) e a solução de vitamina foram esterilizadas com o emprego de um kit de filtração estéril, com membrana de 0,2 μ m. As soluções

de L-treonina, vitamina e de CPRG foram guardadas à temperatura de 4°C. As outras soluções foram armazenadas em temperatura ambiente.

Meio mínimo

O meio mínimo foi feito com a adição dos reagentes listados a 1L de água ultrapura: 13,61 g de KH_2PO_4 ; 1,98 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 4,2 g de KOH; 0,2 g de MgSO_4 ; 1mL de solução de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (40mg/50mL de água ultrapura); 50 mg de L-leucina; 50 mg de L-histidina; 50 mg de adenina; 20 mg de L-arginina; 20 mg de L-metionina; 30 mg de L-tirosina; 30mg de L-iso-leucina; 30 mg de L-lisina-HCl; 25 mg de L-fenilalanina; 100 mg de ácido glutâmico; 150 mg de L-valina; 375 mg de L-serina.

Solução de glicose

A solução de glicose foi preparada a 20% m/v (20 g/100 mL), dissolvendo a glicose em água ultrapura.

Solução de ácido L-aspártico

Foi preparada na concentração de 4 mg. mL⁻¹, com água ultrapura.

Solução de L-treonina

A solução estoque foi preparada na concentração de 24 mg. mL⁻¹ (600 mg/25 mL) com água ultrapura.

Solução de sulfato de cobre (II)

A solução sulfato de cobre (II) foi preparada na concentração de 20 mM (0,5g/100mL), com água ultrapura.

Solução de vitamina

Esta solução foi preparada adicionando os reagentes a 180 mL de água ultrapura: 8 mg de tiamina, 8 mg de piridoxina, 8 mg de pantetonato de cálcio, 40 mg de inositol, 20 mL de solução de biotina (2 mg/100 mL de água ultrapura).

Cepa *Saccharomyces cerevisiae*

A cepa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi construída por técnicas de engenharia genética e está disponibilizada pela Glaxo Group

Research (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996). A cepa utilizada no processo de transformação foi a BJ1991 (BISTAN et al., 2012). A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante utilizada foi cedida pela professora Marcia Dezotti (UFRJ). O preparo da cepa foi em capela de fluxo laminar de acordo com o protocolo de Routledge e Sumpter (1996) com algumas modificações.

Congelamento

Ao término de cada ensaio foi feito o congelamento com as células restantes. Nos tubos criogênicos estéril com volume de 2 mL, a levedura foi colocada e adicionado o glicerol já esterilizado a 121°C por 15 minutos, na proporção de 40% (900 µL de células em meio de cultivo e 600 µL de glicerol estéril). Os tubos criogênicos foram levados ao freezer com temperatura de -20 °C. Dessa forma, podem ficar armazenados até 1 ano. E com a temperatura de -80 °C podem ficar guardadas até 5 anos.

Processo para descongelar o pré-inóculo e inóculo.

Para utilização da cepa 48h antes do ensaio a cepa foi descongelada e efetuado o pré-inóculo. As células do tubo criogênico foram ressuspensa em 10 mL de meio de cultivo em um frasco de cultivo novo e estéril. Esses frascos foram incubados a 28 °C por 24 horas e ficaram sob agitação de 150 rpm, em uma incubadora com agitação orbital (Marca Quimis, modelo Q816M20).

O inóculo foi realizado colocando 100 µL da cultura do pré-inóculo em um frasco novo de cultivo estéril com 10 mL de meio de cultivo, ficando incubado mais uma vez sob as mesmas condições do pré-inóculo, por 24 horas. Com este processo a cepa fica pronta para o ensaio.

Preparo do meio de análise do ensaio YES

Para o preparo do meio de análise foram separados tubos tipo falcon estéreis e/ou frascos de vidro esterilizados a 121 °C por 15 minutos. O meio com a levedura é feito e após o meio de análise. O procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar com os passos a seguir:

Meio com cultura de levedura

No tubo falcon estéril de 50 mL adiciona-se 4 mL do meio de cultivo e 3 mL do cultivo da levedura. A absorbância foi lida a 620 nm. Conforme a faixa de absorbância atingida é determinado o próximo passo:

Absorbância 0,8 a 1,0: faixa boa, cultura pronta para o uso.

Absorbância inferior a 0,8: adicionar pequenos volumes de levedura até atingir a absorbância de 0,8.

Absorbância superior a 1,0: adicionar pequenos volumes de meio de cultivo até atingir a faixa entre 0,8 a 1,0.

A cultura retirada da capela para a leitura de sua absorbância é descartada, por ter saído da capela e exposta a contaminação. O método utilizado foi adaptado de Routledge e Sumpter(1996).

Meio de análise

Foram utilizados tubos Falcon de 50 mL e adicionados 25 mL do meio de cultivo, 250 µL de solução de CPRG e 25 µL do meio com a cultura de levedura.

8.9 Ensaio YES

A metodologia para o ensaio YES foi desenvolvida por Routledge e Sumpter (1996) e adaptado por Bila (2005). Foram utilizadas para as análises microplacas de 96 poços, com fundo chato e tampa estéril. A preparação foi efetuada em capela de fluxo laminar e as amostras avaliadas em duplicatas.

O ensaio é iniciado com a diluição dos extratos por extração em fase sólida. A diluição e concentração das amostras são feitas com a finalidade de garantir que estarão dentro da curva do controle positivo e que posteriormente possa ser calculada a atividade estrogênica. As diluições foram feitas em placas de 96 poços e os extratos das amostras diluídos na proporção 1:2. Dessa forma, a seguir foi destacado os passos deste procedimento:

- Adicionar 100 µL de etanol (grau HPLC) na primeira fileira de poços de diluição do extrato, com exceção do primeiro poço;

- No primeiro poço, adicionar 200 µL do extrato da amostra;

- No segundo poço, adicionar 100 µL retirados do primeiro poço e agitar;
- No terceiro poço, adicionar 100 µL retirados do segundo poço e agitar;
- Este procedimento é feito até o último poço, que ficará com o volume final de 200 µL.

Após a diluição os extratos das amostras foram transferidos para placa de análise no volume de 10µL para cada poço em duplicata. Após a placa fica dentro da capela secando completamente e depois foi dado prosseguimento ao ensaio.

8.9.1 Curva padrão do controle positivo 17β-estradiol

Para realização do ensaio YES foi realizada uma curva padrão do controle positivo 17β-estradiol como referência, a cada nova batelada de testes uma nova curva foi obtida. Para este procedimento foi usada uma solução estoque na concentração de 54,48 µgL⁻¹ realizada a partir de 17β-estradiol (> 98%, Sigma-Aldrich®) em etanol (grau HPLC, Sigma-Aldrich®). A diluição da curva foi realizada em série na placa preparada para a diluição. Para este procedimento foram efetuadas diluições de 1:2

As placas de ensaio são preparadas, iniciando com a adição de 10 µL de etanol em cada poço nas linhas que correspondem aos brancos. Após, foram transferidos 10 µL, retirados da placa de diluição de cada amostra para cada poço da linha apropriada da placa de ensaio. Após a evaporação das amostras, foram adicionados 200 µL do meio de análise em cada poço. Na sequência, foi adicionado o meio de análise nas linhas de amostra.

As placas foram fechadas e lacradas com fita adesiva nas laterais e agitadas por 2 min em um agitador de placas de 96 poços (IKA, MS-3). Após, foram incubadas em estufa aquecida a 30 °C, por 72 horas. Ao fim deste tempo de incubação, as placas foram retiradas da incubadora, possibilitando verificar a mudança de coloração nos poços que passam de amarelo a tons de rosa,

quando há atividade estrogênica e aumento da turbidez nos mesmos, como resultado da produção da β -galactosidase e do crescimento da levedura.

Foram realizadas as leituras das placas nos comprimentos de onda de 575 nm, para cor e 620 nm para turbidez, em um espectrofotômetro com entrada para placa de 96 poços (Softmax Pro 5, SpectraMax M3). Posteriormente a leitura, as placas foram autoclavadas a 121°C por 15 minutos antes de serem descartadas.

A solução estoque de 17 β -estradiol tem a concentração de 54,48 $\mu\text{g.L}^{-1}$, porém a curva de 17 β -estradiol abrange concentrações inferiores na ordem de ng.L^{-1} , indo de 2724 ng.L^{-1} a 1,3301 ng.L^{-1} , pois ao adicionar os 200 μL do meio de análise em cada poço, automaticamente é feita outra diluição da concentração da solução no poço.

Em posse dos valores das leituras de absorbância seguiu-se a construção dos gráficos com as curvas dose-resposta do ensaio. Inicialmente corrigidos os valores de absorbância, conforme a Equação 2, apresentada por Bila (2005).

$$\text{Abs}_{\text{corrigida Amostra}} = \text{Abs}_{575\text{Amostra}} - (\text{Abs}_{620\text{ Amostra}} - \text{Abs}_{620\text{ Branco}}) \quad \text{Equação 2}$$

Esta correção foi efetuada para cada poço da placa, empregando os valores de absorbâncias obtidos nos dois comprimentos de onda para cada concentração na curva. Para o cálculo desta correção, utilizou-se a média dos valores das absorbâncias das duas fileiras de brancos correspondentes às amostras resultando em uma média de 24 amostras de branco. Assim, os dados apresentados correspondem à média das absorbâncias das amostras analisadas em duplicata.

A curva dose-resposta do controle positivo 17 β -estradiol foi construída relacionando os valores de absorbância corrigida em função da concentração, sendo expresso em ngL^{-1} em escala logarítmica. Enquanto que as curvas dos extratos das amostras foram expressas em percentual, sendo construídas da mesma maneira da curva dose-resposta do controle positivo 17 β -estradiol.

Para o cálculo do CE_{50} do 17 β -estradiol foi obtido a partir de sua curva padrão. O valor de CE_{50} corresponde àquela concentração que elucida 50% da maior resposta obtida da β -galactosidase no ensaio YES, em relação à curva

padrão. Para o 17 β -estradiol o CE₅₀ foi expresso em ngL⁻¹. Para as substâncias padrões também foi calculado o CE₅₀ a partir de sua curva padrão, expresso em ngL⁻¹ e para o cálculo do CE₅₀ utilizado programa Origin® 6.0

Em relação as amostras, foi calculado o equivalente estradiol (EQ-E₂) da máxima indução da β -galactosidase, através da interpolação dos dados da curva da amostra com os da curva do controle positivo 17 β -estradiol. Para esse cálculo utilizou-se a equação 3, onde: y é o valor de Abs_{corrAmostra}, x é a concentração da substância estrogênica no ensaio. Onde A_1 é a máxima indução da atividade estrogênica, A_2 o limite de detecção, x_0 o valor de CE₅₀ e p é a inclinação da região mediana da curva como estimado de uma regressão linear/log da parte linear da curva dose-resposta.

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^p} + A_2$$

Equação 3

Após a aplicação da fórmula, o valor foi dividido pelo fator de concentração utilizado na EFS chegando ao valor real de EQ-E₂ da amostra. Para avaliar o potencial estrogênico de cada substância padrão em relação ao controle positivo 17 β -estradiol, determinou-se a potência relativa estrogênica (PR). Esta relação é definida pela Equação 4 .

$$PR = \frac{CE50_{17\beta\text{-estradiol}}}{CE50_{\text{substância}}}$$

Equação 4

Foi utilizado o controle positivo 17 β -estradiol que possui potência relativa 1. Quando o valor da PR é maior que 1, significa que a substância padrão analisada possui maior estrogenicidade em relação ao controle positivo (17 β -estradiol). E quando a PR é menor que 1, significa que a amostra possui menor potencial estrogênico em relação ao controle positivo.

A potência relativa é determinada em relação ao padrão de 17 β -estradiol pode ser considerada como um ensaio biológico indireto. Nesses ensaios assume-se que as amostras analisadas se comportem como uma diluição ou uma forma mais concentrada do padrão. Esta comparação direta entre as

amostras é válida somente sob algumas condições. As curvas dose-resposta do padrão e das amostras devem ser paralelas e a máxima resposta que pode ser atingida por ambas que devem ser idênticas (BILA, 2005).

Nas análises de atividade estrogênica, alguns compostos das amostras podem inibir o crescimento da levedura. Essa inibição chamada de citotoxicidade é percebida pela ausência de turbidez no fundo do poço. Frische et al. (2009) descreve a utilização do controle da absorbância a 620 nm, para quantificar a inibição do crescimento da levedura devido à toxicidade das amostras, esta equação é apresentada abaixo.

$$\textit{Toxicidade} = 1 - \left(\frac{\text{ABS}_{620 \text{ amostra}}}{\text{ABS}_{620 \text{ branco}}} \right) \quad \text{Equação 5}$$

Assim, a equação, $\text{Abs}_{620(\text{amostra})}$ corresponde à medida da leitura de absorbância a 620 nm de cada diluição da amostra, ou seja, à média da duplicata de cada um dos poços da linha da amostra. Já $\text{Abs}_{620(\text{branco})}$ corresponde à média da leitura da absorbância a 620 nm para as duas linhas de branco correspondentes à cada amostra analisada em duplicata. Neste cálculo é considerada a média de 24 poços. Embora algumas amostras visualmente não apresente toxicidade é indicada a aplicação da fórmula, a fim de assegurar a veracidade do resultado (SOTO et al., 1995; FRISCHE et al., 2009).

Esta equação deve ser aplicada primeiramente na amostra 100% concentrada (1º poço da placa de ensaio) se existir inibição do crescimento da levedura, este poço será a primeira concentração a se observar a ocorrência. Depois da aplicação da fórmula se a inibição for observada, aplica-se a equação nos poços seguintes até que a inibição não seja mais observada. A inibição é expressa em percentual em comparação ao crescimento da levedura no controle negativo (branco).

Portanto, o resultados do ensaio YES é efetuado com a verificação da amostra quanto a resposta estrogênica positiva, não apresentado esta resposta, avalia-se a presença de toxicidade como apresentado na Equação 4, se houver toxicidade, a amostra deve ser mais diluída. Caso não tenha, provavelmente a amostra não é estrogênica, ou a estrogenicidade está abaixo do limite de detecção (LD) para este ensaio (RASMUSSEN & NIELSEN, 2002).

A amostra apresentando resposta estrogênica positiva formando uma curva sigmoidal. Procede-se calculando o CE_{50} e a PR se for substância padrão, se for amostra ambiental calcula-se o EQ-E₂. Caso a amostra não apresente curva dose-resposta sigmoidal, mas apresente uma resposta maior que o critério de negatividade (branco). Se for uma amostra ambiental calcula-se o EQ-E₂, mas se for uma substância padrão é preciso prepará-la mais concentrada para atingir a curva sigmoidal e assim calcular o EC_{50} e a PR (FRISCHE et al., 2009).

9. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste trabalho foram realizadas análises por GC/MS da presença de 11 micropoluentes :4-nonilfenol, 4-octilfenol, Bisfenol A, Ibuprofeno, Diclofenaco, Naproxeno, Genfibrozila, Estrona, 17β -estradiol, 17α -etiniestradiol, Estriol) em amostras de sedimentos da Baía de Guanabara e praias Adão e Eva. Foram feitas também análise de toxicidade com a bactéria *Aliivibrio fischeri*, ensaio YES e análises cromatográficas foram efetuadas com CLAE/FLU e GC/MS.

No processo de análises foram realizados filtração, extração em fase sólida e clean up das amostras utilizadas para CLAE/FLU e GC/MS e YES. A partir dos extratos alcançados foram analisados 12 amostras por GC-MS, 06 amostras por CLAE/FLU, e 17 amostras para YES. Para análise de toxicidade foi feito o elutriado dos sedimentos de 09 amostras entre Baía de Guanabara e praias Adão e Eva.

Foram realizadas três campanhas no verão de 2013, verão de 2014 e inverno de 2015. Tendo destaque para primeira campanha que ocorreu no Rio Maracanã e Canal do Mangue por ser um período sem chuvas que dificultou a coleta de sedimentos com a draga Van Veen e não foi possível coletar em todos os pontos escolhidos.

9.1 Ensaio YES Resultado das amostras do Rio Maracanã, Canal do Mangue e Baía da Guanabara

9.1.1 Limite de Detecção e Quantificação

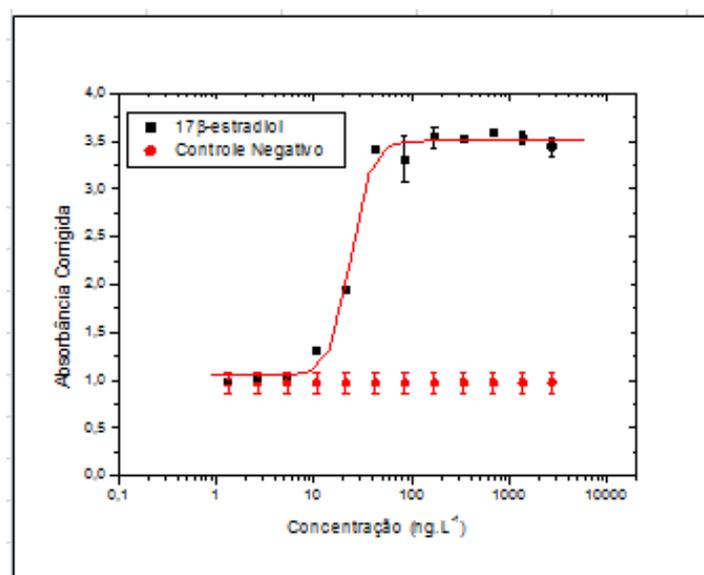
Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) determinam a sensibilidade do método utilizado. O LQ é a menor concentração que pode ser quantificada, levando em conta os limites de exatidão e precisão e o LD é a menor concentração de analito identificada pelo método. Cada ensaio efetuado tem uma curva dose-resposta do controle positivo 17β -estradiol na faixa de 2724 ng L⁻¹ a 1, 3301 ng L⁻¹. Nesse estudo, foi obtido o valor médio de CE₅₀ de 43 ng L⁻¹.

Em posse dos dados da curva dose-resposta do controle positivo, o 17β estradiol é definido os limites de detecção e de quantificação do método. O cálculo do LD foi definido considerando a atividade estrogênica positiva,

quando maior que 10% do valor do branco. Para o cálculo do LQ foi considerada a leitura do branco analítico, mais três vezes o desvio padrão das leituras.

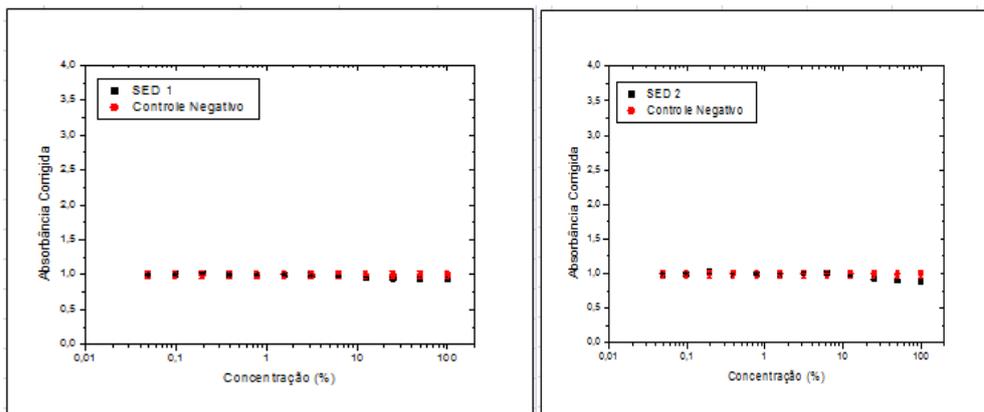
Os cálculos de LD e LQ foram feitos a partir de 20 ensaios independentes, assim o LD do ensaio YES foi de 10 ng L^{-1} e o LQ foi de 20 ng L^{-1} foram considerados, sem levar em conta a concentração das amostras. Devido a concentração das amostras de 500 vezes, pela extração em fase sólida, o ensaio ficou com uma detecção de $0,02 \text{ ng L}^{-1}$ e de quantificação a partir de $0,04 \text{ ng L}^{-1}$, apontando para uma alta sensibilidade do método. Na Figura 14 a curva dose-resposta do controle positivo 17β -estradiol.

Figura 14. Curva dose-resposta do controle positivo 17β -estradiol no ensaio YES.



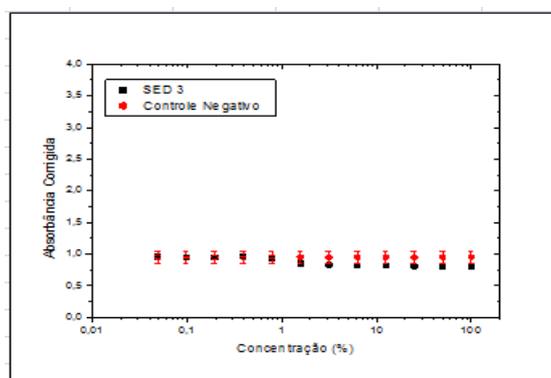
No ensaio YES, as amostras de sedimento do Rio Maracanã e Canal do Mangue apresentaram citotoxicidade em todos os pontos de amostragem, apontando para uma toxicidade nos sedimentos coletados, mesmo em pontos considerados mais limpos como o Alto da Boa Vista. Todavia, após a diluição das amostras no ensaio YES, a citotoxicidade persistiu não sendo possível determinar a estrogenicidade das amostras. Nas Figuras 15 (a,b,c,d,e), são apresentadas as curvas dose-resposta das amostras de sedimento (SED 1, SED 2, SED 3, SED 6, SED 8) respectivamente (a,b,c,d,e) para o ensaio YES.

Figura15. Curvas dose-resposta das amostras de sedimento do Canal do Mangue para o ensaio YES. (a) SED 1, (b) SED 2, (c) SED 3, (d) SED 6 e (e) SED 8.

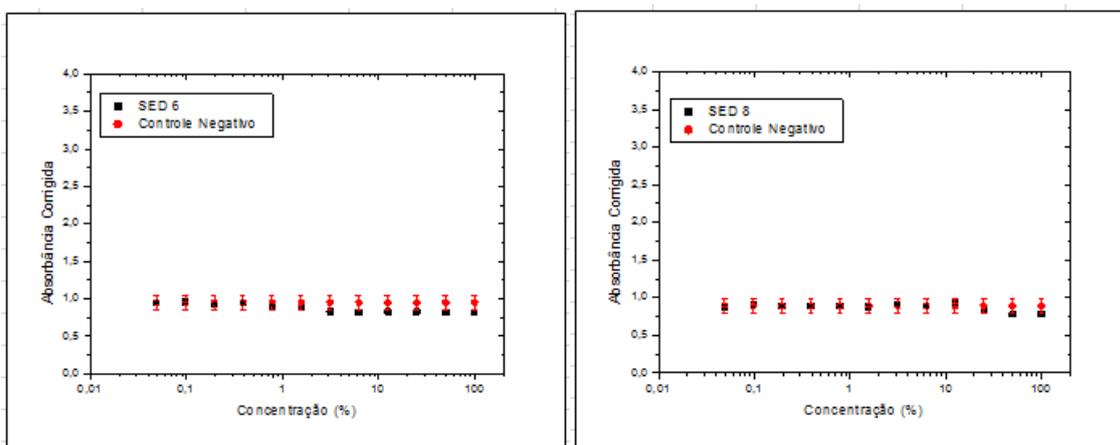


(a)

(b)



(c)

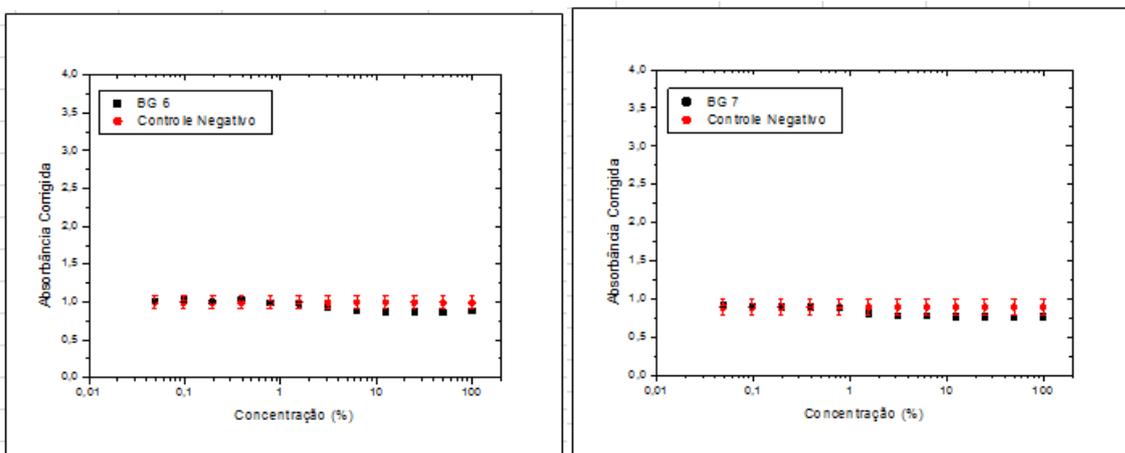


(d)

(e)

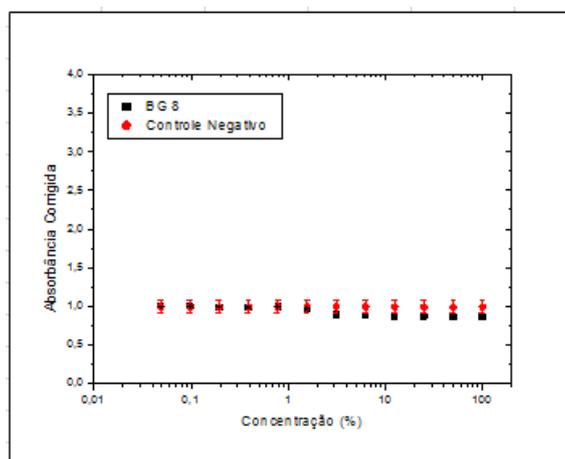
Os pontos de coletas selecionados ao longo do Rio Maracanã e Canal do Mangue são áreas que tem como características o despejo de esgoto *in natura*, uma grande circulação de pessoas e veículos entre outras fontes de poluição. Esses fatores potencializam a incidência de substâncias estrogênicas, fármacos, entre outros (GEROLIM, 2008; JANEX-HABIBI *et al.*, 2009). Cabe citar que nesses mesmo pontos de amostragens foram detectados por NASCIMENTO(2016), atividade estrogênica entre 0,10 a 1,58ng L⁻¹ em água superficial, apontando que maiores concentrações podiam ser encontradas nos sedimentos. Foram realizadas também análises em três pontos de amostragens da Baía de Guanabara que apresentaram citotoxicidade, (BG6, BG7 e BG8) conforme figura 16 (a,b,c).

Figura 16. gráficos da curva dose-resposta das amostras da Baía da Guanabara (a) BG6, (b)BG7 e (c) BG8).



(a)

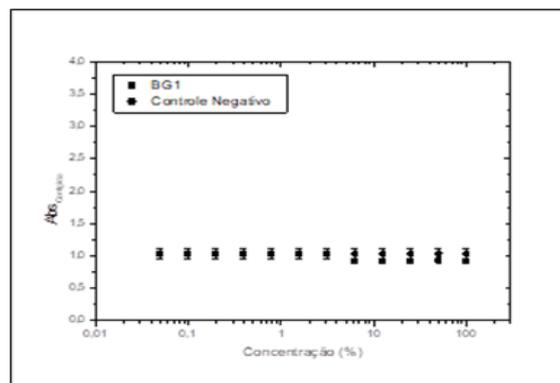
(b)



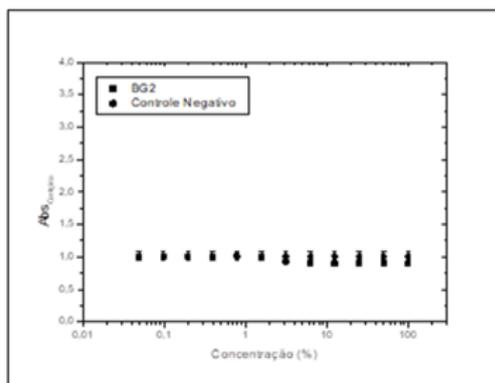
(c)

No intuito de diminuir a citotoxicidade das amostras, foram propostas modificações no método de extração das amostragens de sedimento da Baía de Guanabara. Com base em estudos desenvolvidos por Kim et al (2016) e Zhang et al (2013) que adicionaram EDTA em amostras de solo para remoção de metais. Assim, neste estudo o EDTA foi empregado para avaliar o comportamento das amostras na presença e na ausência deste composto. Na Figura 17, são apresentadas as curva dose-resposta das amostras de sedimento (BG1, BG2, BG2 EDTA, BG10, BG10 EDTA, ADÃO 11, ADÃO 11 EDTA, EVA12, e EVA12 EDTA) Respectivamente (a,b,c,d,e,f,g,h,i) no ensaio YES.

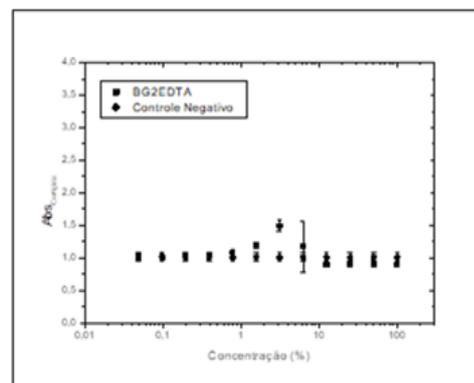
Figura 17. Curva dose-resposta das amostras de sedimento (a) BG1 (b) BG2, (c) BG2 EDTA, (d) BG10, (e)BG10 EDTA, (f)ADÃO 11, (g) ADÃO 11 EDTA, (h) EVA12, e (i) EVA12 EDTA) no ensaio YES utilizando EDTA no preparo da amostra.



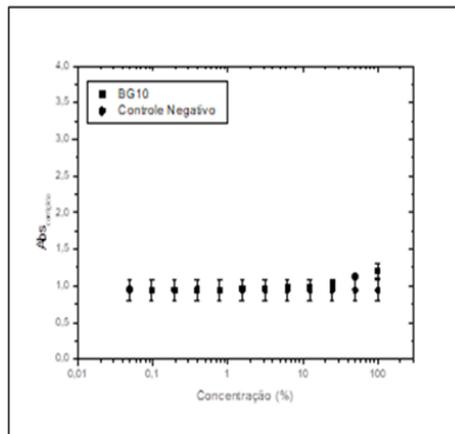
(a)



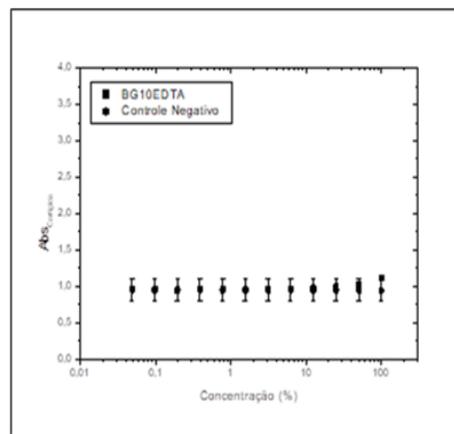
(b)



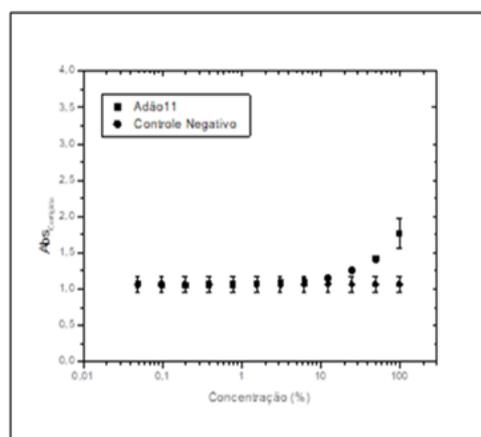
(c)



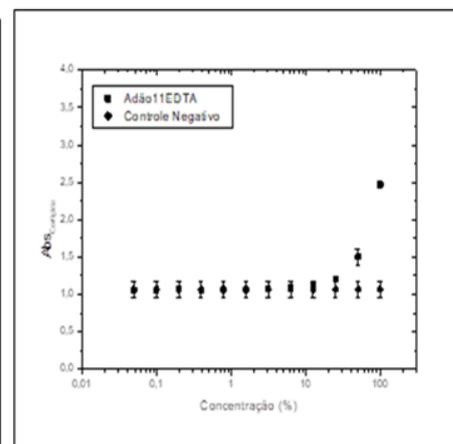
(d)



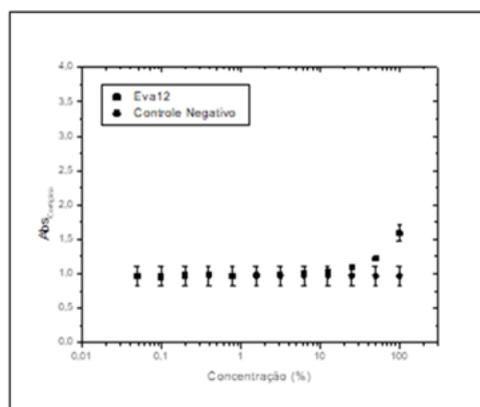
(e)



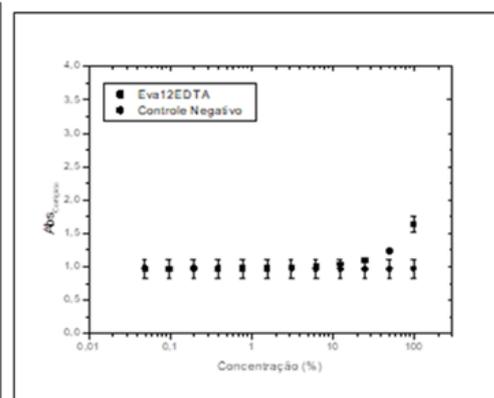
(f)



(g)



(h)



(i)

Na segunda etapa do ensaio YES para as amostras de sedimento, BG2EDTA, Adão11, Adão11EDTA, Eva12 e Eva12EDTA, foi possível determinar a atividade estrogênica e a amostra BG2EDTA apresentou citotoxicidade inicial e a atividade estrogênica nas concentrações 3, 125% e 1,56% nas amostras mais diluídas. A inibição do crescimento da levedura foi observada no estudo de MAGALHÃES (2016) em toda a campanha com uma porcentagem de 45% a 96%, sendo observado o efeito em poços de menores diluições na placa de 96 poços após a incubação. No estudo de Silva (2014), foi descrita a inibição em sua análise em esgoto bruto.

Vale esclarecer que a avaliação de desreguladores endócrinos em sedimentos ainda são pouco investigadas, dado a complexidade desta matriz, alguns autores atribuem essa dificuldade a lipofilicidade e suas frações distribuídas, tantos nos sedimentos, quanto no material particulado. Segundo pesquisas, muitas substâncias químicas ainda estão abaixo do limite de detecção dos métodos analíticos (BRIAN et al., 2007; DORES & FREIRE, 2000).

O ensaio YES se mostrou efetivo e robusto e uma ferramenta importante nas análises com amostras ambientais e estudo de avaliação de risco. Contudo, nas amostras de sedimentos é preciso considerar compostos químicos não monitorados no estudo, além de outros tipos de poluentes presentes na matriz estudada (SOTO et al., 2004; SARMAH et al., 2006; VIGANÒ et al., 2008).

9.2 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE/FLU)

Para detecção e quantificação das amostras da Baía da Guanabara, o método analítico ofereceu boa linearidade. As concentrações utilizadas para as análises ficaram entre 50 e 500 ppb para o BPA e 100 ppb para os hormônios. Os valores do coeficiente de correlação (R^2) foram acima de 0,99 para todos os compostos. Para o BPA o limite de detecção (LD) foi de $1,889 \mu\text{g L}^{-1}$ e o limite de quantificação (LQ) de $62,5 \mu\text{g L}^{-1}$. Para os hormônios só foi detectado o E3 em 100 ppb. No entanto, os compostos E2 e EE2 ficaram abaixo do limite de detecção (LD). Na Tabela 14, estão

destacadas as concentrações de BPA, E3, na Baía de Guanabara quantificadas no ensaio por (CLAE/FLU).

Tabela 14. Concentrações de BPA, E3, na Baía de Guanabara

CLAE/FLU		
Pontos de coleta	Analito BPA - ng/g	Analito E3 – ng/g
BG1	8.80	2.81
BG2	19.75	< LD
BG3	0.36	< LD
BG4	5.70	< LD
BG5	0.40	< LD
BG6	18.68	< LD

Fonte: Arquivo pessoal

A metodologia utilizada foi efetiva para o Bisfenol A e para o E3. O BPA foi detectado em todos os pontos, variando entre 0.36 a 19.75 ng/g. As maiores concentrações foram observadas nos pontos BG2 Ilha do Governador, BG6 na zona portuária do Rio de Janeiro, O ponto BG1, também na Ilha do Governador e BG4 São Gonçalo. O hormônio E3 só foi quantificado no ponto BG1 na Ilha do Governador. Os demais analitos não foram detectados, possivelmente por estarem disponíveis em outra curva.

9.3 Cromatografia gasosa com espectrometria de massas (GC/MS)

As amostras de sedimento da Baía de Guanabara com e sem EDTA foram analisadas no GC/MS para identificar e quantificar os micropoluentes (4-nonilfenol, 4-octilfenol, Bisfenol A, Ibuprofeno, Diclofenaco, Naproxeno, Paracetamol, Genfibrozila, Estrona, 17 β -estradiol, 17 α -etiniestradiol e Estriol). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Resultados obtidos nas análises por GC/MS

Analito/ amostra ng/g	EVA 12	EVA 12 EDTA	BG9 EDTA	JUJ BG10	JUJ BG 10	BG7	ADÃO 11	BG 8 EDTA	BG 8	JUJ 10 EDTA	BG 9 EDTA	BG 7 EDTA
Bisfenol A	20.25	8.73	11.06	3.45	2.75	1.41	1.41	2.7	4.25	1.98	4.39	5.44
4-octilfenol	<LD	<LQ	0.94	0.1	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0.04
4-nonilfenol	<LD	<LD	1.07	3.01	<LD	0.11	0.34	<LD	<LD	0.25	0.6	0.36
Genfibrozila	1.39	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0.69	<LQ
Naproxeno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	15.48	<LD	<LD	<LD	<LD
Ibuprofeno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Diclofenaco	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0.76	0.87	<LD	0.64	<LD	<LD
Estrona	<LD	<LD	<LD	5.67	<LQ	<LQ	<LQ	<LD	<LD	<LD	3.08	<LD
Estradiol	10.97	18.05	3.22	<LD	3.89	<LD	2.67	2.85	<LD	<LD	<LD	4.46
Etinilestradiol	<LD	<LD	<LD	0.46	<LD	<LD	3.85	<LD	<LD	<LD	<LD	22.89
Estriol	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0.5	<LD	<LD	<LD	<LD

Fonte: Arquivo pessoal

As concentrações obtidas para alguns compostos no sedimento ficaram abaixo do limite de detecção e outros abaixo do limite de quantificação do método. Entre os compostos avaliados, o BPA foi o composto detectado nas amostras de sedimento coletadas em todos os pontos de amostragem. De acordo com Staples, et al. (1998), o BPA é uma substância utilizada largamente nas indústrias, seu uso extensivo na produção de plásticos policarbonatos, resinas epóxi e outras funcionalidades. Por esta razão tem sido detectado mundialmente nas amostras de esgoto doméstico. Isto, tornando-se um fator preocupante, devido à precariedade no tratamento de esgoto no Brasil.

Neste estudo, o menor valor quantificado foi de 0.04 ng/g de 4-octilfenole o maior valor quantificado foi de 17 α -etiniestradiol (22.80ng/g). Entre os fármacos (Naproxeno, ibuprofeno, genfibrozila e diclofenaco), o Ibuprofeno ficou abaixo do limite de detecção para todos os pontos de amostragens.

As praias de Adão e Eva, embora consideradas as áreas mais limpas dos pontos coletados, apresentaram quantificado hormônios, fármacos e

fenóis, enquanto áreas consideradas mais contaminadas não apresentaram quantitativo esperado. Embora isto não signifique que os micropoluentes não estejam presentes. Todavia tais respostas que podem estar relacionadas toxicidade das amostras. As concentrações encontradas neste estudo estão em conformidade com as concentrações observadas em outros estudos com sedimentos, entre a literatura analisadas. Apenas os autores como CALDWELL et al. (2012); PUY-AZURMENDI et al, (2013) quantificaram maiores concentrações. Esses dados podem ser observados na Tabela 16 apresenta os micropoluentes detectado em amostras de sedimentos coletadas em vários países.

Tabela 16. Micropoluentes detectado em amostras de sedimentos coletadas em vários países.

Autor	Local	Micropoluento	Concentrações: (ng/g)
Stewart et al. 2014	Nova Zelândia	(E1, E2, EE2)	LQ entre 5-20
Silva.(2016)	Ceará/Brasil	(E1, E2, EE2)	LQ entre 0, 0039-0, 2147 LQ
Bezerra, (2014)	São Paulo/Brasil	(E1, E2, EE2, E3)	LD 1,0µg g-1 para E1 e 21,2-28,5g-1 outros compostos
Shi et al. 2014	China	(E2)	<0.30
Shi et al. 2014	China	(EE2)	<0.7
Caldwell et al. 2012	China	(4-NF)	1.5-456.0
Puy-Azurmendi et al. 2013	Espanha	(4-NF)	91.9-193.7
Puy-Azurmendi et al, 2013	Espanha	(4-NF)	197.8-257.2
Shi, et al. 2014	China	(E1)	<1.9

Caldwell et al. 2012	China	(BFA)	3.7-25.3
Puy-Azurmendi et al. 2013	Espanha	(BFA)	0.01
Puy-Azurmendi et al. 2013	Espanha	(BFA)	0.04
Caldwell et al. 2012	China	(4OF)	0.7-12.1
Puy-Azurmendi et al. 2013	Espanha	(4OF)	0.02

Fonte: Arquivo pessoal.

Vários trabalhos científicos têm alertado quanto ao perigo associado aos Desreguladores Endócrinos. No Brasil a pesquisa vem crescendo, porém ainda tem muito a estudar, principalmente sobre os impactos que os microcontaminantes podem causar nos seres vivos. Os trabalhos com sedimentos marinhos ainda são poucos, devido a todos os interferem agregados a essa matriz, que demanda mais estudos para estabelecimento de um método analítico mais adequado. O método GC/MS mostrou boa recuperação, linearidade, precisão. Na Tabela 17 Concentrações encontradas dos micropoluentes analisados.

Tabela 17 – Concentrações de micropoluentes no Mundo

Micropolvente	País	Concentração (ng/L)	Referência
Estrona (E1)	Itália	1,5	Ferreira, 2008 <i>apud</i> Baronti <i>et al.</i> , 2002
	Alemanha	0,10 – 4,1	Kuch e ballschmitter, 2001

	Inglaterra	0.2 - 17	Xiao <i>et al.</i> , 2001
	Japão	0.2 - 6,6	Isobe <i>et al.</i> , 2003
	França	1,1 – 3,0	Cargouet <i>et al.</i> , 2004
	EUA	1,2	Zuo <i>et al.</i> , 2006
	Koréia	n.d. - 1,03	Shin <i>et al.</i> , 2011
	China	6 – 13,3	Liu <i>et al.</i> , 2011
	Brasil	3.500 – 5.000	Ghiselli, 2006
	Brasil	<16	Montagner e Jardim, 2011
	Brasil	n.d. - 39	Dallegrave,2011 <i>apud</i> Sodr�e <i>et al.</i> ,2010
17β-estradiol	Itália	0,11	Ferreira, 2008 <i>apud</i> Baronti <i>et al.</i> , 2002
	Alemanh a	0,15 – 3,6	Kuch e ballschmitter, 2001
	Japão	<0,3 – 1,0	Isobe <i>et al.</i> , 2003
	França	1,4 – 3,0	Cargouet <i>et al.</i> , 2004
	Canadá	8,0 – 9,0	Viglino <i>et al.</i> , 2008
	Brasil	1.900 - 6000	Ghiselli, 2006
	Brasil	106 – 6.800	Montagner, 2007
	Brasil	<45 – 6.806	Montagner e Jardim, 2011
	Brasil	n.d	Souza, 2011
Estriol (E3)	Itália	2,0 – 5,0	Dallegrave,2011 <i>apud</i> Laganà <i>et al.</i> ,2004
	Inglaterra	1,2 – 3,1	Xiao <i>et al.</i> , 2001
	França	1 – 2,5	Cargouet <i>et al.</i> , 2004
	Brasil	1 – 7,27	Kuster <i>et al.</i> , 2007
17α- etinilestradiol (EE2)	EUA	4,7	Zuo <i>et al.</i> , 2006
	França	1,1 – 2,9	Cargouet <i>et al.</i> , 2004
	Alemanh a	0,10 – 5,1	Kuch e ballschmitter, 2001
	Japão	n.d	Isobe <i>et al.</i> , 2003

	Brasil	1.200 – 3.500	Ghiselli, 2006
	Brasil	<17 – 4.390	Montagner e Jardim, 2011
	Brasil	n.d	Brandt, 2012
Ibuprofeno	China	1417ng/L	Peng e colaboradores (2008)
	Reino Unido	74ng/L	Kasprzyk- Hordem e colaboradores (2009)
	EUA	77,2 ng/L	Wang e colaboradores (2011)
Naproxeno	China	328 ng/L	Peng e colaboradores (2008)
	Reino Unido	146ng/L	Kasprzyk- Hordem e colaboradores (2009)
4-nonilfenol	China	6526ng/L	Peng e colaboradores (2008)
Bisfenol A	China	881 ng/L	Peng e colaboradores (2008)
Diclofenaco	Reino Unido	261ng/L	Kasprzyk- Hordem e colaboradores (2009)
Paracetamol	Reino Unido	1534 ng/L	Kasprzyk- Hordem e colaboradores (2009)
	EUA	<28 ng/L	Wang e colaboradores (2011)

Fonte: Arquivo pessoal

Nas análises do YES foi possível observar citotoxicidade em todas amostras analisadas, no Rio Maracanã e Canal do Mangue, inclusive no ponto SED 1, coletado no Alto da Boa Vista e considerando menos degradado. Neste caso os dados obtidos, apontam para o grau de contaminação em que se encontram as áreas de coletas.

Os resultados do ensaio YES nos pontos coletados na Baía de Guanabara apresentaram citotoxicidade para os pontos BG1 e BG10. Após as diluições seriais, apenas os pontos BG2 e praias Adão e Eva apresentaram atividade estrogênica nos poços mais diluídos. Logo, os dados obtidos no ensaio YES confirmam os resultados do teste de toxicidade exibidos com da bactéria *Aliivibrio fischeri*. Os resultados obtidos na análise de

toxicidade com o organismo-teste *Aliivibrio fischeri* podem ser observados na Tabela 18.

Tabela 18. Resultados obtidos na análise de toxicidade com o organismo-teste *Aliivibrio fischeri*.

Pontos de coleta	CE50	FT
BG1	29,52%	= 32
BG2	45,21%	>64
BG3	6,4%	>64
BG4	13,22%	>64
BG6	NO	-
BG7	Hormensis	-
BG8	Hormensis	-
EVA	NO	-
ADÃO	Hormensis	-

NO – não observado

FT – Fator de toxicidade

Considerando a escala de Bulich (1982), as amostragens avaliadas demonstram alto grau de toxicidade. As maiores detecções observadas foram nos pontos BG3 com um FT >64 e um CE50 de 6,4%. Nas amostras BG6 e praia Eva, não foi observado (NO). Embora os pontos BG7, BG8 e praias Adão tenham apresentado efeito “Hormensis” para este teste. Este efeito segundo Calabrese (2008) pode ser considerado um mecanismo de evolução, pois gera uma resposta adaptativa dos organismos, para evitar a extinção da espécie. Conforme pesquisas, o aumento da luz emitida por parte das bactérias pode ser interpretado como presença de substâncias tóxicas nas amostras, produzindo falsos negativos como respostas (FULLADOSA et al., 2007b).

Desse modo, as respostas negativas, não podem necessariamente ser interpretadas como ausência de toxicidade. Mas, apontam para necessidade maior investigação, demandando outros ensaios, com organismos de diferentes níveis tróficos, como por exemplo, peixes e algas, além da realização de ensaios crônicos.

CONCLUSÃO

Mediante ao desafio em realizar análises em matrizes como sedimentos, a metodologia analítica tanto na cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE/FLU), quanto na cromatografia gasosa (GC/MS) foram consideradas efetivas para a determinação e quantificação dos micropoluentes com (CLAE/FLU) o BPA e E3 e por (GC/MS) BPA, E1, E2, E3 e EE2, IBU, 4OF, 4NF, GEN, NPX, DCF, nas amostragens da Baía da Guanabara; enseada de Jurujuba e nas praias Adão e Eva.

As maiores quantificações para os micropoluentes encontrados nas amostras de sedimentos em todas as campanhas realizadas (verão de 2013, verão de 2014 e inverno de 2015), foram para o Bisfenol A. Entre os hormônios as maiores quantificações no ensaio YES foram nos pontos de coleta BG2 com amostras utilizando EDTA e nas praias Adão e Eva. Para o CLAE/FLU o hormônio E3 foi o único quantificado, enquanto o BPA foi quantificado em todos os pontos de coleta selecionados. No GC/MS, o hormônio EE2 foi o que apresentou maior quantificação seguido do BPA e do fármaco Naproxeno.

Na análise da atividade estrogênica, o ensaio YES mostrou-se robusto, eficiente e uma importante ferramenta para determinação dos micropoluentes com potenciais estrogênicos presentes nas amostragens de sedimentos analisados. Os índices de estrogenicidade mais expressivos foram detectados nas amostras de sedimentos coletadas na Baía da Guanabara, o que aponta para a incidência de compostos poluidores constantemente introduzidos neste corpo hídrico.

Nos ensaios para detecção da citotoxicidade, as amostragens do Maracanã e canal do Mangue, apresentaram os maiores potenciais citotóxicos, entre 2% a 93%. Nas amostragens da Baía da Guanabara, os potenciais citotóxicos detectados, variaram de 0,7% a 95%. Na Enseada de Jurujuba, 93% a 95%, nas praias Adão e Eva não apresentaram citotoxicidade para as amostras analisadas. O ensaio de toxicidade aguda com a bactéria marinha *Aliivibrio fischeri* realizado nas amostras de sedimento da Baía da Guanabara, se apresentaram muito tóxicas, o ponto mais crítico foi o BG3 referente a Ilha de Paquetá com um CE50 de 6,4%. Nos pontos BG6 e Eva não foi observada toxicidade para este organismo-teste. Nas amostras BG7 e BG8

foi observado efeito hormesis, que pode ser uma resposta adaptativa, utilizada pelos organismos como forma a evitar a extinção da espécie. Esses pontos são referentes a zona portuária de Niterói e Enseada de Jurujuba áreas altamente poluídas.

Vale esclarecer que os resultados obtidos neste trabalho, corroboram com a necessidade de monitoramento sistemático sobre a presença e o comportamento de micropoluentes em sedimentos de fundo. Igualmente importante é a necessidade da utilização de outros testes que forneçam diferentes parâmetros de análises, metodologias específicas e mais efetivas, devido complexidade em avaliar a presença micropoluentes em sedimentos de fundo.

Mediante aos desafios para a validação de metodologias em pesquisa acerca da contaminação em sedimentos de fundo por micropolvente. Especialmente em ambientes salinos, como a Baía da Guanabara. Permanece a perspectiva que este trabalho venha a contribuir dentro da relevância ambiental, como mais uma ferramenta, na avaliação dos riscos em matrizes ambientais complexas, como os das áreas estudadas.

REFERÊNCIAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera). **NBR 12713**, 2009.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 15411. **Ecotoxicologia aquática** – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Vibrio fischeri* (Ensaio de bactéria luminescente), 2006.

ABREU, Mauricio de. Evolução Urbana do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: **IPLANRIO**/Jorge Zahar Editores, 1987.

ADAMS, G.P. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation. **Theriogenology**; v. 54, p. 19-24. 1994

ANA - Agência Nacional de Águas (Brasil). Atlas esgotos: despoluição de bacias hidrográficas / Agência Nacional de Águas, Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental. -- Brasília: ANA, 2017.

AMADOR, E.S. Baía de Guanabara e ecossistemas periféricos - Homem e Natureza. Rio de Janeiro, **Retroarte Gráfica e Editora**. 539 p.1997.

AMARANTE, F. O. A água no espaço urbano: uma abordagem sócio-ambiental e sua aplicação na Grande Tijuca. Rio de Janeiro, **Dissertação de Mestrado**. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 202p. 2006.

AQUINO S.F; BRANDT, E.M.F; CHERNICHARO, C.A.L. Removal of pharmaceuticals and endocrine disrupters in sewage treatment plants: literature review. **Eng Sanit Ambient** | v.18 n.3. 187-204, 2013.

ARAGÃO, M. A., ARAÚJO, R. P. A. Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações. In: **Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos**.

ARAÚJO, R. P. A. Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações. In: Avaliação da Qualidade de Sedimentos. ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. São Carlos: **RiMa**, 2006. p. 269-286.

APHA; AWWA; WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. **22th edição**. 1360 f., 2012.

ARENZON, A.; NETO, T. J. P.; GERBER, W. Manual sobre a toxicidade em efluentes industriais. **SENAI de Artes Gráficas** Henrique d'Ávila Bertaso. Porto Alegre, 40 p., 2011.

BAPTISTA NETO, J. A., GINGELE F. X.; Leipe T., BREHME I. Spatial distribution of heavy metals in superficial sediments from Guanabara Bay: Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental Geology**, 49:1051-1063, 2006.

BAPTISTA NETO J.A, WALLNER-KERSANACH, M & PATCHINEELAM, S.M (Organizadores). **Poluição Marinha**. Editora Interferência, Rio de Janeiro. 2008.v. 1, p. 197-236.

BARROS, C.M; NOGUEIRA, M.F.G. Superovulação em zebuínos de corte. In: 1o. **Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**. Londrina, p. 212-222, 2004.

BILA, Daniele Maia; DEZOTTI, Márcia. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova** (Impresso), v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.

BILA, Daniele Maia. Degradação e Remoção da Atividade Estrogênica do Desregulador Endócrino 17 β -Estradiol pelo Processo de Ozonização. 2005. **Tese** (Doutorado em Programa de Engenharia Química) - Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia – COPPE / Universidade Federal do Rio de Janeiro.

BILA, D. M; DEZOTTI, M . Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Química Nova** (Impresso), v. 30, p. 651-666, 2007.

BIRKETT, J. W., LESTER, J. N., 2003, Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Process, 1ª edição, Lewis Publisher.

BITTENCOURT, S. Sorção de poluentes orgânicos emergentes em lodo de esgoto. **Eng. Sanit. Ambient.** Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 43-53, mar. 2016.

BORELLI, Elizabeth. Urbanização e qualidade ambiental: o processo de produção do Espaço da costa brasileira. **Revista Internacional Interdisciplinar Interthesis**, v. 4 n. 1. Florianópolis jan/jun 2007. Disponível em. Acesso em 28 de agosto de 2016.

BORRELY, S. I., TORNIERI, P. H. & SAMPA, M. H. O. Avaliação da toxicidade aguda em efluentes industriais, afluentes e efluentes de estação de tratamento de esgotos. 395-406 p. In: E. L. G. Espíndola, C. M. R. Botta-Paschoal, O. Rocha, M. B. C. Bohrer & A. L. Oliveira Neto (eds.) **Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI**. RiMa, São Carlos, São Paulo. 2002.

Boxall, A. B. A., Kolpin, D. W., Halling-Sorensen, B. e Tolls, J. (2003). Are Veterinary Medicines Causing Environmental Risks? **Environmental Science & Technology**, 37(15), pp. 286a-294a.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v 72, p 248-259.1976.

BRASIL. ANA – AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. Conjuntura dos recursos hídricos: informe 2015. Agência Nacional de Águas. - Brasília: **ANA**, 2015. _____ . Indicadores de qualidade - índice de balneabilidade (IB). Disponível em. Acesso em 11 de setembro de 2016.

BRASIL. Resolução CONAMA Nº. 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água de diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Conselho Nacional do Meio Ambiente**, 2005.

BRASIL. SNIS – SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÃO SOBRE SANEAMENTO. Disponível em. Acesso em 27 de agosto de 2016. _____ . Disponível em <http://www.snis.gov.br/diagnostico-residuossolidos/diagnostico-rs-2014>>. Acesso em 27 de agosto de 2016.

POLUIÇÃO nos mares. Ambiente Brasil. Disponível em: **tratabrasil**. Acesso em 28 de agosto de 2016.

BRITTO, A. L. Implantação de infraestrutura de saneamento na região metropolitana do Rio de Janeiro: uma avaliação das ações do Programa de Despoluição da Baía de Guanabara. Revista Brasileira de Estudos Urbanos e Regionais, v. 5, n. 1, 2003.

CADWELL, D.J; MASTROCCO F; ANDERSON P.D, LANGE, R, SUMPTER, J. P. Predicted-no-effect concentrations for the steroid estrogens estrone, 17 β -estradiol, estriol, and 17 α -ethinylestradiol. **Environmental Toxicology and Chemistry** 31: 1396-406, 2012.

CELIZ, M. D; TSO, J; Aga, D. S. Pharmaceutical Metabolites in the Environment: Analytical Challenges and Ecological Risks. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 28(12), pp. 2473-2484, 2009.

CETESB. **Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo** (2006).

CORRÊA, R. L. Região e organização espacial. São Paulo: Ática. Niterói-Bairros - Secretaria Municipal de Desenvolvimento, Ciência e Tecnologia de Niterói – 2007.

Costa, C & Dordio, . Podem os Medicamentos que Usamos Prejudicar o Meio Ambiente. Disponível em http://home.uevora.pt/~ueline/quimica_para_todos/podem_os_medicamentos_q_ue_usamos_prejudicar_o_meio_ambiente.pdf. Acessado em 01 dezembro, 2017,

Costa, M. A. M. Da lama ao caos: um estuário chamado Baía de Guanabara. **Cad. Metrópole**, maio 2015, vol.17, no.33, p.15-39. ISSN 2236-9996.

COSTA, C. C D; GUILHOTO; Martins, J. J. Saneamento rural no Brasil: impacto (83) 3322.3222 contato@conbracis.com.br www.conbracis.com.br da fossa séptica biodigestora. **Engenharia Sanitaria e Ambiental, Rio de Janeiro**, v. 19, dez./abr. 2014.

COSTA M. F. C; SPRITZER P.M; HOH I A; BACHEGA T A. S. S. Effects of endocrine disruptors in the development of the female reproductive tract. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 2014; 58/2.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, v. 7, p. 21-25, 1998.

DIAS, C.V; GOMES, F.W; BILA, D.M., SANT'ANNA JUNIOR, G.L; DEZOTTI, M., 2015. Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 120: 41 - 47.

DOMINGUES, D. F., BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações. In: **Seleção, Manutenção e Cultivo de Organismos Aquáticos**.

FARRÉ M., PÉREZ, S., KANTIANI, L. e BARCELÓ, D. Fate and Toxicity of Emerging Pollutants, their Metabolites and Transformation Products in the **Aquatic Environment. Trends in Analytical Chemistry**, 27(11), pp. 991-1007, 2008.

FERGUSON, E.M; ALLISON, M; ALLISON, G; SEWEARER, S.E; HASSELL, K.L (2013) Fluctuations in natural and synthetic estrogen concentrations in a tidal estuary in south-eastern Australia. **Water Research** 47(4).

FERNÁNDEZ M, Bourguignon N, Lux-Lantos V, Libertun C. Neonatal exposure to bisphenol A and reproductive and endocrine alterations resembling the polycystic ovarian syndrome in adult rats. **Environ Health Perspect.** 2010

FERREIRA, M. G. M. **Remoção da atividade estrogênica de 17 β -estradiol e de 17 α -etinilestradiol pelos processos de ozonização e O₃/H₂O₂**, 2008. Rio de Janeiro: Tese. Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

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

FUNDO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A INFÂNCIA (UNICEF). UNICEF e OMS lançam relatório sobre diarreia, a segunda maior causa de mortalidade infantil. Disponível em: Acesso em: 25 de nov. 2017.

GÖTZ, C. W.; STAMM, C.; FENNER, K. et al. Targeting aquatic microcontaminants for monitoring: exposure categorization and application to the Swiss situation. **Environmental science and pollution research international**, v. 17, n. 2, p. 341-54, 2010.

GUERRA, Antônio José (Org.). Geomorfologia Urbana. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 2011.

HALEM, Z. M; ROSS, D. J., COX, R. L., 2014. Evidence for intraspecific endocrine disruption of *Geukensia demissa* (Atlantic ribbed mussel) in an urban watershed. *Comparative biochemistry and physiology, part A* **175**: 1-6.

HSIEH CY; YANG L; KUO WC; ZEN YP. Efficiencies of freshwater and estuarine constructed wetlands for phenolic endocrine disruptor removal in Taiwan- *Science of the Total Environment* 463–464 (2013) 182–191.

HUGGETT, D. B; FORAN, C. M., BROOKS, B. W; WESTON, J; PETERSON, B; MARSH, K. E; LA POINT, T. W; SCHLENK, D. Comparison of in Vitro and in Vivo Bioassays for Estrogenicity in Effluent from North American Municipal Wastewater Facilities. *Toxicological Sciences*, **72**, p. 77–83, 2003.

IBGE, Instituto brasileiro de geografia e estatística. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (**PNSB**), 2008. Rio de Janeiro, Brazil. 2010.

INEA (Instituto Estadual do Ambiente). O Estado do Ambiente: Indicadores Ambientais do Rio de Janeiro 2010. Rio de Janeiro: **SEA/INEA/IMPrensa** RJ, 2011.

INEA (Instituto Estadual do Ambiente). www.inea.rj.gov.br. Acesso em 20/05/2013. IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). www.ibge.gov.br. Acesso em 20/05/2017.

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. Orientação sobre validação de métodos analíticos. 20 p. , 2010.

JAFFÉ, R. Fate of hydrophobic organic pollutants in the aquatic environment: a review. *Environmental Pollutions*, v. 69, p. 237-257, 1991.

JARDIM, W. F.; MONTAGNER, C. C.; PESCARA, I. C.; UMBUZEIRO, G. A.; BERGAMASCO, A. M. D. D.; ELDRIDGE, M. L.; SODRÉ, F. F. An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water. *Separation and Purification Technology*, 84, 3–8, 2012.

JELIC, A., GROS, M., PETROVIC, M., GINEBREDÁ, A. e BARCELÓ, D. Occurrence and Elimination of Pharmaceuticals During Conventional Wastewater Treatment. *Handbook of Environmental Chemistry*, 19, pp. 1-24, 2013.

JICA. JAPAN INTERNACIONAL COOPERATION AGENCY. The Study on Management and Improvement of the Environmental Conditions of Guanabara Bay of Rio de Janeiro, The Federative Republic of Brazil. Rio de Janeiro, **Main Report**. 2003.

JUNGCLAUS, G.A., LOPEZ-ÁVILA, V., HITES, R.A. Organic compounds in an industrial wastewater: a case study of their environmental impact. **Environmental Science & Technology**, p.12-88. 1978

KABIR, E. R; RAHMAN, M. S; RAHMAN, I. A review on endocrine disruptrs and theioxir possible impacts on human health. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 40:241:258, 2015

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J.The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK.**Water research**, v. 42, n. 13, p. 3498-518, 2008.

KJERFVE, B; RIBEIRO, C.H.A; DIAS, G.T.M; FILIPPO, M.A; QUARESMA, V.S, Oceanographic characteristics of an impacted coastal bay: Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brazil. *Continental Shelf Research*. Volume 17, Issue 13, November 1997, Pages 1609–1643

KOLÁR, M., URBANEX, K., LATAL, T., 2001 “Antibiotic Selective Pressure and Development of Bacterial Resistance” **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17 (5), pp. 357-363.

KNIE, J. L. W. & LOPES, E.W. B. Testes Ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: **FATMA/GTZ**, 289 p., 2004.

KUSTER, M.; AZEVEDO, D. A.; LÓPEZ DE ALDA, M. J.; AQUINO NETO, F. R.; BARCELÓ, D. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental Waters from Rio de Janeiro (Brazil). **Environment International**, v. 35, n. 7, p. 997–1003, 2009.

LAPWORTH, D. J.; BARAN, N.; STUART, M. E.; WARD, R. S. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. **Environmental Pollution**, v. 163, p. 287-303, 2012.

LI, B.; CAO, J.; XING, C.; WANG, Z.; CUI, L. Assessing estrogenic activity and reproductive toxicity of organic extracts in WWTP effluents. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 39, n. 2, p. 942-52, 2015.

MELO, C. F. **Conversão do biocida triclosan catalisada por enzimas e avaliação da remoção da atividade antibacteriana**. 2010. Tese (Doutorado em Programa de Engenharia Química) - Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia – COPPE / Universidade Federal do Rio de Janeiro.

MELO, S. A. S.; TROVO, A. G., BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P. Degradation of Residual Pharmaceuticals by Advanced Oxidation Processes. **Química Nova**, v. 32, n.1, p. 88-197, 2009.

MIRANDA, C. D., CASTILLO, G., 1998 "Resistance to Antibiotic and Heavy Metals of Motile Aeromonads from Chilean Freshwater" **Science of the Total Environment**, v. 224 (1-3), pp. 167-176.

MCKEON, D. M., CALABRESE, J. P., BISSONNETTE, G. K., 1995 "Antibiotic Resistant Gram-Negative Bacteria in Rural Groundwater Supplies" **Water Research**, v. 29 (8), pp. 1902-1908.

OHE, P. C. VON DER; DULIO, V; SLOBODNIK. A new risk assessment approach for the prioritization of 500 classical and emerging organic microcontaminants as potential river basin specific pollutants under the European Water Framework Directive. **The Science of the total environment**, v. 409, n. 11, p. 2064-77, 2011

PANITZ, C. M. N. Projeto de oficinas ecológicas em ecossistemas costeiros: uma proposta de educação ambiental costeira. In: Educação ambiental marinha e costeira no Brasil (Pedrini, A. G. org.). Rio de Janeiro, **EdUERJ**, 181-199, 2010.

PAZ, M. G. A; ALMEIDA, M. F; GÜNTHER, W. M. R. Prevalência de diarreia em crianças e condições de saneamento e moradia em áreas periurbanas de Guarulhos, SP. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 15, n. 1, mar. 2012.

PERILLO, E.B.F., AMORIM, M.C.S. Para entender de saúde no Brasil 4. In: ZUCCHI, P., MWAMAKAMBA, L.W. Avanços de sustentabilidade em saúde no Brasil. São Paulo: **LCTE Editora**, 2011, p.49-61.

POLETO, C.; MERTEN, G. H. (Org.) **Qualidade dos sedimentos**. Porto Alegre: ABRH, 2006. 397p.

PORTELA, R.A. et al. A incidência das doenças diarréicas e a sua relação com a ausência de saneamento: uma revisão bibliográfica. **Hygeia**, v.7, n.13, p.150-156, 2011.

PUY-AZURMENDI, E; ORTIZ-ZARRAGOITIA, M; VILLAGRASA M, KUSTER, M, ARAGÓN. Endocrine disruption in thick lip grey mullet (*Chelon labrosus*) from the Urdaibai Biosphere Reserve (Bay of Biscay, Southwestern Europe). **Science of the Total Environment** 443: 233-244, 2013..

RAIMUNDO, C. C. M. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia**, 2007. Departamento de Química Analítica. **Dissertação**. Universidade Estadual de Campinas.

RANGEL, C.M.A., BAPTISTA NETO J.A; LIMA, L.G., OLIVEIRA, P.S. Speciation of Phosphorus in an estuarine system inside Guanabara Bay, RJ – SE Brazil. In: Conley, D.C., Masselink, G., Russell, P.E. and O'Hare, T.J. (eds.)

Proceedings 12th International Coastal Symposium (Plymouth, England), **Journal of Coastal Research**, Special Issue No. 65, pp. 1194-1199, ISSN 0749-0208, 2013.

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

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; CARDOSO A. A. Introdução à química ambiental. 2. ed. São Paulo: **Artmed** 2009. p. 29.

ROCHA, M. J., CRUZEIRO, C., REIS, M., PARDAL, M. A., ROCHA, E., 2014. Spatial and seasonal distribution of 17 endocrine disruptor compounds in an urban estuary (Mondego River, Portugal): evaluation of the estrogenic load of the area. **Environmental Monitoring and Assessment** 186: 3337-3350.

RODIL, I.F; JARAMILLO, E; ACUÑA, E; MANZANO, M; VELASQUEZ, C. Long-term responses of sandy beach crustaceans to the effects of coastal armouring after the 2010 Maule earthquake in South Central Chile, **Journal of Sea Research**, 108: 10-18, 2016.

ROSMAN, P. C. Relatório de Modelagem de Processos Sedimentológicos na Região do Canal do Manguê Porto do Rio de Janeiro - RJ. Rio de Janeiro: Fundação COPPETEC.ater in Galicia (NW Spain). **Chemosphere**, v. 86, n. 10, p. 1040-9, 2012.

ROUTLEDGE, E. J., SUMPTER, J. P. "Estrogenic Activity of Surfactants and Some of their Degradation Products Assessed Using a Recombinant Yeast Screen" **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15 (3), pp. 241-248, 1996.

SECRETARIA MUNICIPAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA. 1999. Niterói: **Perfil de uma Cidade** – Niterói, RJ.

SILVA, A. F. **Apostila**: Atlas básico de anatomia, 2008.

SILVA, F. S; BITENCOURT, J. A. P; SAVERGNINI, F; GUERRA, L. V; BAPTISTA NETOJ. A; CRAPEZ, M. A. C. Bioavailability of Organic Matter in the Superficial Sediment of Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. Anu. **Inst. Geociência**, 34, 1: 52-63, 2015.

SILVA, C. G. A. & 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.

SODRÉ, F. F; PESCARA, I. C; MONTAGNER, C. C; JARDIM, W. F. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, 96: 92–98, 2010.

SUN, W.; JIA, R.; GAO, B. Simultaneous analysis of five taste and odor compounds in surface water using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Frontiers of Environmental Science & Engineering in China**, v. 6, n. 1, p. 66–74, 2010.

SCHUH, M. C.; CASEY, F. X. M.; HAKK, H.; DESUTTER, T. M.; RICHARDS, K. G.; ODUOR, P. An on-farm survey of spatial and temporal stratifications of 17 β -estradiol concentrations. **Chemosphere**, v. 82, n. 11, p. 1683–9, 2011.

SCHMIDT, W.; O'ROURKE, K.; HERNAN, R.; QUINN, B. Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on the marine mussel (*Mytilus* spp.) and their comparison with standardized toxicity tests. **Marine pollution bulletin**, v. 62, n. 7, p. 1389–95, 2011b. Elsevier Ltd.

SWEDENBORG, E.; RÜEGG, J.; MÄKELÄ, S.; PONGRATZ, I. Endocrine disruptive chemicals: mechanisms of action and involvement in metabolic disorders. **Journal of molecular endocrinology**, v. 43, n. 1, p. 1–10, 2009.

SHI, J; LIU, X; CHEN, Q; ZHANG, H. Spatial and seasonal distributions of estrogens and bisphenol A in the Yangtze River Estuary and the adjacent East China Sea. **Chemosphere** 111, 2014.

TUCCI, C. E. M. Gestão da água no Brasil. Brasília: UNESCO, 2001. Águas urbanas. **Estudos Avançados** (USP), v. 22, p. 97-112, 2008.

U.S. EPA. **Aquatic life criteria for contaminants of emerging concern**. 2008.

VALDÉS, M. E; MARINO, D. J; WUNDERLIN, D. A; SONOZA, G; RONCO, A. E, CARRIGUIRIDORDE, P. Screening Concentration of E1, E2 and EE2 in Sewage Effluents and Surface Waters of the “Pampas” Region and the “Río de la Plata” Estuary (Argentina). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** 94:1, 2015.

WANG. B; HUANG, B; JIN, W; ZHAO, S; LI, F; HU, P; Pan, X. Occurrence, distribution, and sources of six phenolic endocrine disrupting chemicals in the 22 river estuaries around Dianchi Lake in China. **Environmental Science and Pollution Research** 20(5), 2013.

WAYE, A; TRUDEAU, V. L. Neuroendocrine disruption: more than hormones are upset. **Journal of toxicology and environmental health**. Part B, Critical reviews, v. 14, n. 5-7, p.270-91, 2011.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors: an assessment prepared by an expert group on behalf of the World Health. **Organization, the International Labour Organization, and the United Nations Environment Programme**, 2002.

YAN, C; YANG, Y; ZHOU, J; NIE, M; LIU, M. Selected emerging organic contaminants in the Yangtze Estuary, China: a comprehensive treatment of

their association with aquatic colloids. **Journal of Hazardous Material**, 283: 1423, 2015.

YOON, Y; RYU, J; OH, J; CHOI, B. G; SNYDER, S. A. Occurrence of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals, and personal care products in the Han River (Seoul, South Korea). **The Science of the total environment**, v. 408, n. 3, p. 636-43, 2010.

ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. 1. ed. São Carlos: RiMa, 478 p. 2008.

ZENG, Q; CAO, W; XU, L; CHEN, Y; YUN, L; LIU, A; ZHANG, J; LU, W. Spatial and temporal evaluations of estrogenic activity in tap water served by a water plant in Wuhan, China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 91, p. 198–203, 2013.