

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ) – ESCOLA NACIONAL DE
SAÚDE PÚBLICA
CURSO DE MESTRADO ACADÊMICO EM SAÚDE PÚBLICA E MEIO
AMBIENTE
WAGNER SANTOS LUCENA**

**DETERMINAÇÃO DE ESTROGÊNIOS EM AFLUENTES DA LAGOA DE
ARARUAMA - RJ**

RIO DE JANEIRO - RJ

2013

WAGNER SANTOS LUCENA

**DETERMINAÇÃO DE ESTROGÊNIO EM AFLUENTES DA LAGOA DE
ARARUAMA - RJ**

Projeto de pesquisa apresentado ao curso de Mestrado em Saúde Pública e Meio Ambiente da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), para obtenção do certificado de Mestre

**PROFESSOR ORIENTADOR:
SERGIO RABELLO ALVES**

Rio de Janeiro

2013

BANCA EXAMINADORA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ALUNO: Wagner Santos Lucena

ORIENTADOR: Sérgio Rabello Alves

MEMBROS TITULARES DA BANCA:

1: Prof. Sergio Rabello Alves

2: Prof Eline Simões Gonçalves

3: Prof Daniele Maia Bila

Data: 27/03/2013

AGRADECIMENTO

Agradeço aos meus pais e amigos pela compreensão, companheirismo, respeito e paciência.

Agradeço também aos professores que tive, que me transmitiram seus conhecimentos e me permitiram chegar até este momento, e em especial ao professor Moacélio Verâneo Silva, grande incentivador e inspirador deste trabalho, ao que este trabalho é uma homenagem *in memoriam*.

RESUMO

Ao longo deste trabalho, foram promovidas, através de 2 campanhas em meses distintos (novembro e dezembro de 2012), determinações de características físico-químicas, de eutrofização, e também das concentrações de estrogênios (por imunoenensaio enzimático ou por GC-MS) em afluentes que desembocam na lagoa de Araruama-RJ. Em relação à determinação dos estrogênios 17 β -estradiol, 17- α etinilestradiol e estrona, foi empreendida a validação de método GC-MS, de acordo com orientações do INMETRO (2007). O método foi otimizado e validado com êxito, obtendo LD de 18,09, 23,87 e 18,89 ng.L⁻¹ e LQ de 28,65, 33,00 e 36,25 ng.L⁻¹ e % de recuperação de 72,93%, 68,99% e 66,11% para 17 β -estradiol, 17- α etinilestradiol e estrona, respectivamente. Os resultados dos parâmetros físico-químicos e de eutrofização mostram que a qualidade das águas dos afluentes na primeira campanha estava pior que na segunda campanha, com piores resultados para os pontos de coleta C (rio regamé, fortemente influenciado por efluente tratado da ETE de Araruama) e D (efluente tratado da ETE de Cabo Frio). Os resultados cromatográficos para o analito 17- α etinilestradiol foram comparados com os obtidos por metodologia por imunoenensaio ELISA monoclonal, cujo LQ é de 50 ng.l⁻¹. Para as amostras analisadas, não se obteve concentrações acima do limite de quantificação para este analito em nenhum dos 2 métodos. Entretanto, no método cromatográfico, é relatado que, na primeira campanha, os pontos de coleta C e D tiveram concentrações pouco acima do limite de identificação para estrona e 17- β estradiol, no ponto C, e para os 3 estrogênios no ponto D. Baseado nos resultados encontrados, existe a suspeita de que os estrogênios possam estar produzindo efeitos reprodutivos à biota residente e que um possível aumento populacional na região de estudo (em virtude de um feriado ocorrido pouco antes da primeira campanha) possa estar envolvida na explicação dos resultados distintos entre as campanhas, embora outros fatores desconhecidos ou ignorados que justifiquem esses achados não possam ser descartados.

Palavras-chave: estrogênios, efluentes, imunoenensaio, cromatografia,

ABSTRACT

In this work, were promoted through campaigns in two different months (November and December 2012), determination of physico-chemical and eutrophication characteristics, and also of estrogens (by enzyme immunoassay or by GC-MS) in effluents that flow into the Araruama lagoon, in Rio de Janeiro state. Regarding the determination of estrogens 17 β -estradiol, 17- α ethinyl estradiol and estrone, there was performed the method validation for GC-MS analysis of estrogens in accordance with guidelines of INMETRO (2007). The method was optimized and validated successfully, getting DL of 18.09, 23.87 and 18.89 ng.L⁻¹ and QL of 28.65, 33.00 and 36.25 ng.L⁻¹ and recovery of 72,93%, 68,99% e 66,11% for 17 β -estradiol, 17- α ethinyl estradiol and estrone, respectively. The results of physico-chemical parameters and eutrophication show that effluents waters quality in the first campaign was worse than the second campaign, with worse results for the collection points C (treated effluent from the STP Araruama) and D (treated effluent from the STP Cabo Frio). The chromatographic results for the analyte 17 α -ethynylestradiol were compared with those obtained by monoclonal ELISA methodology, to which LQ is 50 ng.L⁻¹. All the samples did not obtain concentrations above the limit of quantification for this analyte on any of the two methods. However, in the chromatographic method is reported that in the first campaign, the collection points C and D concentrations were slightly above the limit of identification for estrone and 17- β estradiol, at point C, and for the 3 estrogens in D. Based on these results, there is a suspicion that estrogens may be producing reproductive effects to biota resident and a possible increase in population in the study area (due to a holiday occurred before the first campaign) may be involved in explaining the different results between the campaigns, although other unknown factors that justify these findings can not be discarded.

Keywords: estrogens, effluent, immunoassay, gas chromatography

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estrutura Química do 17- β estradiol (a) ,do 17 α -etinilestradiol (b), do estriol (c) e da estrona (d)	8
FIGURA 2 - Extração de Fase Sólida das amostras com auxílio de sistema Vacuum Manifold.....	32
FIGURA 3 - Mapa de distribuição de Chuvas	38
FIGURA 4: Localização aproximada das Estações de tratamento de Efluentes que circundam a lagoa de Araruama e dos pontos de coleta utilizados	40
FIGURA 5 - Coleta de amostra no ponto A	41
FIGURA 6 - Curva de calibração na matriz e em solvente para 17- β estradiol (a), 17- α etinilestradiol (b) e estrona (c)	48
FIGURA 7 – Cromatograma de determinação dos estrogênios estrona (16,43 minutos), 17- β estradiol (16,78 minutos) e 17- α etinilestradiol dissustituído (17,64 minutos) na concentração 1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em matriz de afluyente.....	49
FIGURA 8 – Curvas de calibração obtidas para 17- β estradiol (8a), 17- α etinilestradiol (8b) e estrona (8c)	52 e 53
FIGURA 9 - Curva de Calibração de 17- α etinilestradiol para teste ELISA monoclonal	59

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Principais Efeitos da estrona e 17- α etinilestradiol em diferentes espécies animais.....	14
QUADRO 2 - Principais Efeitos do 17- β estradiol em diferentes espécies animais.....	15
QUADRO 3 - Condições estabelecidas na metodologia CG-MS	25
QUADRO 4 - Planejamento fatorial para avaliação de robustez de método analítico.....	31
QUADRO 5 - Resultados do teste de otimização da reação de derivatização para as substâncias estrona, 17- β estradiol e 17- α etinilestradiol (na concentração 1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).....	44
QUADRO 6 - Resultados dos testes de otimização da extração em fase sólida para as substâncias estrona, 17- β estradiol e 17- α etinilestradiol (na concentração 0,75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).....	45
QUADRO 7 - Valores usados na elaboração de curva de calibração na matriz de efluente e em solvente.....	47
QUADRO 8 - Análise de valores aberrantes da curva analítica através do teste de Grubbs	49 e 50
QUADRO 9 - Dados para a elaboração da curva de calibração na matriz.....	51 e 52
QUADRO 10 - Quadro 10 - Cálculo do Limite de Quantificação do Método para os estrogênios	54 e 55
QUADRO 11: Resultados resumidos de avaliação da robustez do método.....	56 e 57
QUADRO 12: Resultados obtidos dos padrões em concentrações conhecidas de 17- α etinilestradiol para teste ELISA monoclonal	58 e 59
QUADRO 13 - Parâmetros físico-químicos da primeira campanha	61
QUADRO 14 – Parâmetros físico-químicos da segunda campanha	61

QUADRO 15 – Resultados das análises de DQO e de nitrogênio e fósforo totais para amostras da primeira campanha.....	63
QUADRO 16 – Resultados das análises de DQO e de nitrogênio e fósforo totais para amostras da segunda campanha	63
QUADRO 17 – Resultados das análises de amostras ambientais para as 2 campanhas.....	65 e 66
QUADRO 18 – Resultados da metodologia ELISA para as amostras reais da primeira campanha	68
QUADRO 19 – Resultados da metodologia ELISA para as amostras reais da segunda campanha	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Estimativa da excreção diária <i>per capita</i> de estrogênios na espécie humana.....	9
TABELA 2 - Concentrações médias encontradas de estrogênios em diferentes matrizes e locais no Brasil.....	11 e 12
TABELA 3 - Concentrações relatadas de 17 α -Ethinilestradiol em matrizes aquáticas no mundo	12 e 13
TABELA 4 - Variáveis e condições utilizadas no teste de robustez.....	34
TABELA 5 - Evolução da população residente nos municípios que circundam a lagoa de Araruama em 10 anos.....	37
TABELA 6 - Resultados do Teste de Levene para avaliação de Homocedasticidade.....	50 e 51
TABELA 7 - Cálculo do Limite de Detecção do Método para os estrogênios.....	53 e 54
TABELA 8 - Cálculo do limite de repetitividade no intervalo de confiança de 95%.....	55
TABELA 9 - Resultados da Precisão intermediária através do teste <i>t</i> de Student.....	55 e 56
TABELA 10 - Resultados dos testes de recuperação dos estrogênios em 3 concentrações diferentes (em $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	58
TABELA 11 - Dados da Estação Meteorológica automática de Arraial do Cabo.....	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BSTFA - N,O – bistrimetilsililtrifluoracetamida

CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente

DBO – demanda biológica de oxigênio

DDT – Dicloro difenil tricloroetano

DES – Dietilestilbestrol

DNA – ácido desoxirribonucleico

DQO – Demanda Química de Oxigênio

EDC – Substâncias interferentes endócrinas

EDSP - Programa de avaliação de desreguladores endócrinos

ELISA - ensaio de imunoadsorção enzimático

ETE – estação de tratamento de efluentes e/ou esgotos

ETA – estação de tratamento de água para consumo humano

FUNASA – Fundação Nacional da Saúde

GC-MS – Cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de Massas

IARC – Associação Internacional de Pesquisa sobre o câncer

LC-MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de Massas

LD – Limite de detecção

LOAEL – nível ou dose mais baixo no qual um efeito adverso é observado

LQ – Limite de Quantificação

MMA – Ministério do Meio Ambiente do Brasil

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

NOAEL – nível ou dose mais alto ao qual não um efeito adverso não é observado

PAH's - hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

PCB's – Bifenilas Policloradas

PNEC - concentração prevista em que não se observa efeitos

TCMS - triclorometilsilano

TBT – Tributilestanho

TPT - trifenilestanho

USEPA – Agencia de Proteção Ambiental dos EUA

VTG – proteína Vitelogenina

YES – Avaliação de estrogênio por levedura

SUMÁRIO

1 – APRESENTAÇÃO	1
2– INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA	2
2.1 – O sistema endócrino e os seus interferentes.....	2
2.2 - Conceitos de toxicidade e avaliação do risco à saúde.....	5
2.3 - Os interferentes endócrinos escolhidos para este estudo: 17 α -Etinilestradiol, estrona, estriol e 17- β estradiol.....	7
2.3.1 – Estrutura Química, Características Físico-Químicas e de excreção	7
2.3.2 – Mecanismo de Ação dos estrogênios naturais e do 17 α -etinilestradiol	9
2.3.3 – Características farmacodinâmicas e efeitos no uso clínico	9
2.3.4 – Difusão no ambiente e Concentrações relatadas na literatura científica	10
2.3.5 – Efeitos Ambientais e na saúde humana	13
2.4 – Principais metodologias laboratoriais para caracterização da atividade estrogênica, e identificação química das 3 substâncias (estrona, 17- β estradiol e 17- α etinilestradiol) em matrizes ambientais	17
2.5 – Estabilidade das substancias em matriz aquática ambiental	20
2.6 – Parâmetros Físico Químicos e características de eutrofização de amostras aquáticas ambientais	20
3 – OBJETIVOS	21
3.1 – Objetivo Geral	21
3.2 - Objetivos Específicos	21
4 – MATERIAIS E METODOLOGIAS	21
4.1 - Preparo das soluções dos padrões de estrogênio	21
4.1.1 - Metodologia por Imunoensaio enzimático com anticorpos monoclonais	21

4.1.2 – Metodologia por Cromatografia a gás acoplada a Espectrometro de Massas ...	22
4.2 – Metodologia para análise por Cromatografia a gás acoplada a Espectrômetro de Massas	22
4.2.1 – Otimização das condições da reação de derivatização	22
4.2.2 – Otimização das condições para a extração de fase sólida	23
4.2.3 - Relação massa/carga dos estrogênios analisados	24
4.2.4 - Condições cromatográficas e método de detecção	24
4.2.5 - Validação das metodologias analíticas	25
4.2.5.1 – Validação da metodologia cromatográfica	25
4.2.5.1.1 – Seletividade e Especificidade	26
4.2.5.1.2 – Linearidade	26
4.2.5.1.3 – Faixa de trabalho	27
4.2.5.1.4 - Limite de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)	28
4.2.5.1.5 – Precisão	29
4.2.5.1.6 – Robustez	30
4.2.5.1.7 – Tendência/Recuperação	31
4.2.6 – Testes de validação e aplicação da Metodologia por Cromatografia a gás acoplada ao Espectrômetro de Massa nas amostras reais	32
4.3 – Metodologia para análise por Metodologia ELISA monoclonal	34
4.3.1 – Validação da Metodologia ELISA monoclonal	34
4.3.2 – Aplicação da Metodologia por Imunoensaio enzimático com anticorpos monoclonais (ELISA)	34
4.4 – Dados da área de Estudo	36
4.5 – Regime Amostral, locais e procedimento de coleta das amostras ambientais	39

4.6 – Análises realizadas em campo	41
4.7 – Análises de Demanda Química de oxigênio (DQO), Nitrogênio e Fósforo Totais.....	41
4.7.1 – Análises de Nitrogênio total	42
4.7.2 - Análises de Fósforo total	42
4.7.3 – Análises de Demanda química de oxigênio (DQO)	43
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 – Metodologia Cromatográfica para 17- α etinilestradiol, estrona e 17- β estradiol .	44
5.1.1 – Otimização do método	44
5.1.1.1 – Estudo das condições da reação de derivatização dos estrogênios	44
5.1.1.2 – Estudo das condições de Extração em Fase Sólida	45
5.1.2 – Validação da Metodologia	46
5.1.2.1 – Seletividade e efeito de matriz	46
5.1.2.2 – Linearidade e faixa de trabalho	49
5.1.2.3 – Limite de Detecção e de Quantificação	53
5.1.2.4 – Precisão	55
5.1.2.5 – Robustez	56
5.1.2.6 – Tendência/Recuperação	57
5.2 – Metodologia ELISA monoclonal para 17- α etinilestradiol	58
5.2.1 – Elaboração da curva de calibração e testes de recuperação	58
5.3 - Características meteorológicas dos dias das coletas e Análises de Campo	60
5.4 – Análises de DQO e de nitrogênio e fósforo totais	63
5.5 – Análises das amostras ambientais dos pontos de coleta por GC-MS	65
5.6– Análises das amostras reais por imunoenensaio	68

5.7 – Limitações do trabalho e sugestões para pesquisas futuras	68
6 – CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1 - APRESENTAÇÃO

A presença de contaminantes orgânicos com atividade estrogênica, também chamados de interferentes endócrinos estrogênicos, em rios, lagos, lagoas e até mesmo na água de consumo humano é um tema que tem gerado cada vez mais preocupação entre diferentes atores sociais (tais como organismos governamentais, pesquisadores do campo da Saúde e Ambiente e movimentos sociais) em virtude da possibilidade de efeitos adversos à biota e ao ser humano decorrentes da exposição a esses agentes químicos¹.

Essas substâncias entram continuamente no ambiente aquático através, principalmente, de efluentes e águas residuais, sendo que muitos deles não são completamente removidos pelos sistemas convencionais de tratamento de esgotos e efluentes², podendo apresentar grande persistência ambiental e serem passíveis de bioacumulação³.

O receio em relação aos possíveis efeitos provenientes dessa exposição se justifica devido ao fato de, mesmo presente em concentrações subterapêuticas à espécie humana nas águas superficiais ou em águas tratadas por estações de tratamento de esgotos e efluentes, é relatado que a contaminação ambiental provocada por interferentes endócrinos estrogênicos, em uma exposição crônica e múltipla de diferentes espécies químicas, produziriam ações deletérias sobre os organismos⁴.

Essas ações impactariam principalmente o sistema reprodutivo e nervoso⁵, e no aparecimento de diferentes tipos de cânceres, sobretudo os relacionados ao sistema reprodutivo^{6,7,8}.

Mediante o quadro exposto, o desenvolvimento de metodologias analíticas (que elucidem os efeitos *in vivo* de interferentes endócrinos estrogênicos, e que os identifique e quantifique como espécies químicas nos diferentes corpos hídricos) é fundamental para que seja avaliado o risco da exposição ambiental a essas substâncias.

Nesse sentido, ao longo deste trabalho foi realizada a identificação e quantificação das concentrações dos compostos estrona, 17 α -Ethinilestradiol e 17- β estradiol, substâncias suspeitas de promover grande contribuição na atividade estrogênica de efluentes domésticos tratados ou não⁹

O ecossistema escolhido para estudo foi a lagoa de Araruama, ecossistema lagunar hipersalino de 220 km² de superfície localizada no estado do Rio de Janeiro – Brasil, principal corpo hídrico receptor de efluentes tratados e não tratados dos municípios de Araruama, Iguaba Grande, São Pedro da Aldeia, Arraial do Cabo e Cabo

Frio¹⁰. Além de um ponto na própria lagoa, foram coletados e analisados amostras de efluente tratado da saída das estações de tratamento da região e amostras de rio (que também recebe efluentes tratados) que desembocam na Lagoa de Araruama.

Para que tal meta fosse alcançada, foi realizada a validação de metodologia analítica cromatográfica (Cromatografia a Gás acoplada a espectrômetro de massa) para quantificação das 3 substâncias (estrona, 17 α -Ethinilestradiol e 17- β estradiol). Além disso, foram comparados os resultados da cromatografia para a substância 17 α -Ethinilestradiol com os encontrados para esse mesmo contaminante por imunoenensaio enzimático (metodologia ELISA monoclonal).

Dessa forma, foi realizada uma discussão dos possíveis impactos causados a biota e as implicações para a população humana residente nos municípios banhados pela lagoa.

2 – INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA

2.1 – O sistema endócrino e os seus interferentes

Uma vez que as substâncias abordadas neste trabalho atuam sobre o sistema endócrino, torna-se necessário uma breve contextualização acerca do funcionamento desse sistema e sobre seus interferentes.

O sistema endócrino, presente sobretudo em animais, está, em conjunto com o sistema nervoso, intimamente relacionado ao controle de funções vitais, influenciando o funcionamento dos demais sistemas corporais. Ele é composto por órgãos que possuem como função a síntese de hormônios. Estes, podem agir tanto localmente quanto serem lançados na circulação sanguínea, indo atuar em outras áreas do organismo, modulando suas atividades¹¹.

Hormônios são considerados sinalizadores químicos. Eles atuam na comunicação entre distintos tipos celulares, que os reconhecem por apresentarem receptores específicos, havendo um reconhecimento molecular. A interação entre o hormônio e seu receptor provoca uma resposta biológica específica¹².

Entre os diversos hormônios presentes nas espécies animais, destacam-se os hormônios estrogênicos esteroidais naturais, como o 17- β estradiol, a estrona e o estriol, que estão presentes em todos os animais vertebrados e em algumas espécies de insetos¹³,
¹⁴.

Embora apresentem diferentes papéis nesses organismos, uma das funções mais marcantes e notórias dos hormônios estrogênicos está relacionada à maturação sexual,

sobretudo feminina, sendo o 17- β estradiol o principal e mais potente estrógeno natural^{15, 12 11}.

Na espécie humana, esses hormônios são sintetizados majoritariamente pelos ovários em mulheres que não atingiram a menopausa. Nos homens e em mulheres pós-menopausa a sua produção é essencialmente extragonadal e está relacionada a transformação metabólica de androgênios de 19 carbonos, sobretudo testosterona e androstenediona, em 17 beta estradiol e estrona. Essa reação é mediada pela enzima aromatase e ocorre particularmente em células mesenquimais do tecido adiposo, nos osteoblastos e condrócitos ósseos, no endotélio vascular e células do musculo liso da aorta e em diferentes locais no cérebro¹⁶.

Existem substâncias exógenas de ocorrência no ambiente que apresentam atividade estrogênica, isto é, são capazes de interagir com os receptores estrogênicos endógenos, influenciando na interação dos hormônios aos seus receptores e, com isso, alterando a resposta hormonal¹⁷.

Tais compostos, como por exemplo o 17 α -Etinilestradiol (um estrogênio sintético utilizado em terapia de reposição hormonal medicamentosa e em anticoncepcionais orais), estão inseridos em um grande grupo de substâncias chamadas interferentes ou desreguladores endócrinos (EDC's).

Essas substâncias podem ter ocorrência natural, como os fitoestrógenos sintetizados no metabolismo de plantas e micoestrógenos no de fungos, ou serem sintéticas, antropogênicas.

Um interferente ou desregulador endócrino é definido como “todo agente exógeno que interfere na síntese, reserva, liberação, transporte, metabolismo, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais dos organismos e responsáveis pela regulação da homeostase e de processos de desenvolvimento”¹⁸.

Esses compostos se caracterizam por promover modificações no sistema endócrino dos organismos, podendo gerar consequências negativas à saúde destes e/ou de seus descendentes.

Os interferentes endócrinos podem atuar sobre diversos alvos biológicos, tais como receptores estrogênicos, androgênicos, da tireóide, entre outros. Uma mesma substância pode ter atividade sobre mais de um alvo biológico, como por exemplo o agrotóxico metoxicloro, que apresenta ação estrogênica e anti-androgênica¹⁹.

Essas substâncias estão largamente difundidas na vida cotidiana. Dentre os compostos mais conhecidos, é possível destacar:

- Fitoestrógenos em plantas, agrotóxicos aplicados na agricultura e ftalatos e bisfenol aplicados em embalagens plásticas²⁰.

- hormônios estrogênicos esteroidais de fonte animal, presentes na carne, leite (inclusive seus derivados) e ovos²¹.

- Alquilfenóis presentes em cosméticos¹.

- Dioxinas e furanos liberados pela queima de plásticos e PAH's gerados pela combustão incompleta de combustíveis fósseis²².

- bifenilas policloradas utilizadas em instalações elétricas, e alquilfenóis e alquilfenóis etoxilados presentes em saneantes industriais e domésticos, tintas, lubrificantes e emulsificantes²³.

- Substâncias orgânicas polibromadas, que são usadas como retardadores de chama em componentes eletrônicos e tecidos¹.

A preocupação com os efeitos relacionados à exposição aos EDC's provém do início do século XX, com a observação da efeitos estrogênicos em animais de laboratório expostos a extratos de órgãos e tecidos reprodutivos femininos²⁴.

Nas décadas de 1960 e 1970, foi relatada a hipótese de associação entre o uso de dietilestilbestrol (DES) com o surgimento de neoplasia vaginal em mulheres jovens que haviam sido expostas a esta substância em período gestacional²⁵.

Foram observados efeitos reprodutivos em animais causados pelo agrotóxico organoclorado Dicloro Difenil Tricloroetano (DDT), amplamente relatado no livro "Silent Spring"²⁶.

No início da década de 1990, houve um aumento do interesse no estudo dessas substâncias, destacando-se a contribuição da Conferência de Wingspread, em 1991, por estimular a discussão sobre as evidências de efeitos à saúde em diferentes organismos pela exposição a substâncias químicas ambientais²⁷. Neste contexto, é possível ressaltar a publicação de um estudo de revisão mostrando evidências da diminuição da qualidade seminal de homens de diversos países, em um período de 50 anos²⁸.

Outro marco histórico foi a publicação do livro "Our Stolen Future: Are We Threatening Our Fertility, Intelligence, and Survival?"⁴ que relata as evidências, apontadas em diversos estudos científicos, de ações de interferência no sistema endócrino e principalmente de efeitos reprodutivos em diferentes espécies causadas pela exposição a interferentes endócrinos.

Ações governamentais buscando incentivar a pesquisa, avaliar e buscar soluções para a questão foram e estão sendo elaboradas. Entre as diversas iniciativas, destaca-se o Programa de avaliação de desreguladores endócrinos (Endocrine Disruptor Screening Program) da Agência de Proteção Ambiental dos EUA²⁹.

Este programa atua no desenvolvimento e validação de testes laboratoriais, na triagem e seleção de substâncias potencialmente desreguladoras, além de propor políticas e procedimentos restritivos à essas substâncias, discutindo o risco ambiental e até humano que elas possam representar²⁹.

Os principais questionamentos sobre a exposição a interferentes endócrinos e seus efeitos ambientais e sobre humanos seriam³⁰:

- a) Quais substâncias seriam capazes de produzir efeitos deletérios, quais seriam estes efeitos, a partir de qual concentração e se esta concentração é superada nas matrizes ambientais.
- b) Dúvidas para se estabelecer concentrações máximas em que não se observa efeitos adversos aos organismos vivos.
- c) Possibilidade de elaborar novas metodologias e avaliar as atuais no que tange a identificar e caracterizar as concentrações dessas substâncias nas diferentes matrizes e/ou prever as consequências causadas pelos interferentes endócrinos em organismos expostos, bem como analisar se estas metodologias seriam acessíveis para o uso em monitoramento.

2.2 – Conceitos de toxicidade e avaliação do risco à saúde

Para se compreender os efeitos à saúde dos organismos provocados pela exposição aos interferentes endócrinos, torna-se necessário entender alguns conceitos básicos de toxicologia

O termo dose é a quantidade total de uma substância recebida pelo organismo. Geralmente está expressa em unidades de massa ou volume por massa de peso corpóreo. As vias digestiva, dérmica/cutânea, e respiratória são algumas das principais portas de entrada das substâncias nos organismos³¹.

Para o entendimento sobre o risco de exposição humana e ambiental, é necessário ainda estabelecer os conceitos de risco, perigo e avaliação de risco.

É entendido como perigo o evento, agente ou condição que teria a capacidade de gerar efeitos indesejados a partir de suas características intrínsecas, enquanto que risco seria uma probabilidade deste perigo se manifestar, tendo uma conotação quantitativa. Com isso, a avaliação de risco seria uma ferramenta para mensurar esses riscos à saúde,

descrevendo-os de acordo com a sua natureza e magnitude, auxiliando numa tomada de decisão quanto ao estabelecimento de um risco aceitável para um determinado agente estressor³².

A avaliação de risco envolve as etapas de identificação do perigo, avaliação de toxicidade (onde se utiliza da relação dose-resposta), avaliação da exposição e caracterização do risco. A relação dose-resposta, mencionada acima, é construída a partir de uma curva que relaciona a incidência de um desfecho (morbidade ou mortalidade), mostrando a proporção que uma população em estudo apresenta um certo desfecho para cada dose estudada³².

Essa curva pode ser influenciada por fatores diversos, tais como os relacionados a polimorfismos genéticos de enzimas de metabolização da(s) substância(s) em teste.

Outro dado toxicológico importante é a curva dose-efeito, que expressa uma relação entre a dose e a intensidade de um efeito graduado, para uma população ou indivíduo¹².

Todas essas informações auxiliam no estabelecimento de limites de segurança ou tolerância na exposição a substâncias tóxicas, que podem ser expressos em doses de referência ou ingestão diária aceitável.

No estabelecimento de limites de exposição para substâncias não carcinogênicas, são utilizados parâmetros como LOAEL (Low Observable Adverse Effect Level) que representam a dose mais baixa no qual um efeito adverso é observado, e NOAEL (No observable Adverse Effect Level), representando a dose mais alta no qual não se observa efeito adverso³³.

Esses parâmetros são obtidos através de uma curva dose-resposta realizada com estudos de experimentação animal em diversas doses da substância em teste. Esses dados são extrapolados para a espécie humana com auxílio de fatores de segurança que englobam fatores de incerteza e ponderação, para que se assegure um menor risco e maior proteção na exposição humana a essa substância. No caso de substâncias carcinogênicas, que podem causar danos com qualquer dose de exposição, normalmente são usadas técnicas de avaliação do risco quantitativo, tentando extrapolar os efeitos para doses baixas com auxílio de modelos matemáticos³³.

De forma geral, alguns dos principais fatores relacionados ao efeito tóxico dos agentes químicos em uma exposição ambiental são^{31, 32}:

- Propriedades intrínsecas da substância: propriedades físico-químicas (lipofilia, solubilidade em água, estado físico, tamanho molecular, etc), natureza dos subprodutos

formados, ligação à proteínas circulantes, persistência ambiental, carcinogenicidade e mutagenicidade.

- Características do organismo exposto: idade, espécie, fatores genéticos (polimorfismos de enzimas), estado nutricional e imunológico, ausência ou presença de patologias pré-existentes, gênero sexual, peso corporal e estado emocional

- Caracterização da exposição: frequência e duração da exposição, vias de entrada no organismo, rota de exposição no ambiente

- Propriedades do ambiente: influências causadas pela temperatura, radiação solar, umidade, entre outros

Muitas vezes, a produção de efeito tóxico pode também estar relacionada a exposição a mais de uma substância, havendo efeitos sinérgicos, aditivos e/ou potenciais, conforme definido abaixo³¹:

- Efeito aditivo: o efeito obtido pela mistura de substâncias, em uma determinada dose, será igual à soma dos efeitos individuais de cada substância envolvida sobre este organismo. Muitas vezes, torna-se difícil avaliar esses efeitos aditivos para substâncias estrogênicas, uma vez que muitas delas não apresentam uma curva dose-resposta linear
- Efeito sinérgico: o efeito final obtido pela mistura será maior que o esperado, sendo superior à soma aritmética dos efeitos individuais de cada uma das substâncias envolvidas.
- Efeito potencial: uma substância terá seu efeito aumentado ao interagir com outra que, originalmente, não apresenta aquele efeito.

2.3 – Os interferentes endócrinos escolhidos para este estudo: 17 α -Ethinilestradiol, estrona, estriol e 17- β estradiol

2.3.1 – Estrutura Química, Características Físico-Químicas e de excreção

As estruturas químicas dos estrogênios naturais 17- β estradiol, estrona e estriol e do estrogênio sintético 17- α Ethinilestradiol são mostradas na figura 1.

As 4 substâncias possuem um radical fenólico ligado a 2 ciclohexanos e um ciclopentano condensados, sendo neste último que se observa as diferenças entre as substâncias.

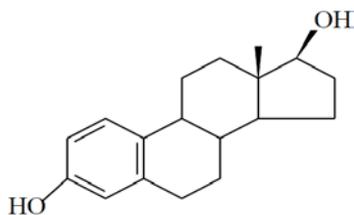


Figura 1 (a) : 17-β estradiol

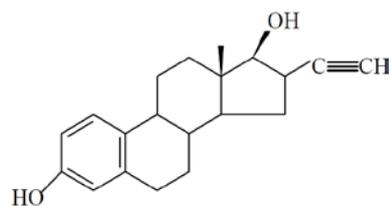


Figura 1 (b) : 17-α etinilestradiol

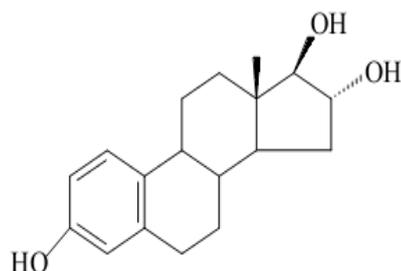


Figura 1 (c) : estriol

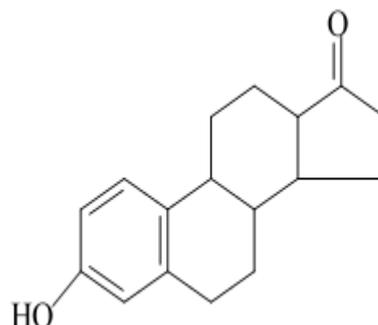


Figura 1 (d) : estrona

Figura 1: Estrutura Química do 17-β estradiol (a), do 17 α-etinilestradiol (b), do estriol (c) e da estrona (d)

Esses estrogênios são lipofílicos, de baixa solubilidade em água e volatilidade. A excreção se dá pela urina e fezes, sendo que a maior parte é liberada na forma conjugada e inativa, através de conjugação glicurônica ou com sulfatos^{34,35}.

O anel fenólico aromático é o responsável pela atividade biológica, que proporciona a atividade estrogênica³⁶. Para o 17-α Etinilestradiol, a presença do grupo etinil no carbono 17 proporciona uma maior potência por via oral, já que inibe o metabolismo de primeira passagem hepática, tornando-o mais biodisponível que os estrogênios naturais¹².

Alguns autores^{37,38,39} associam as concentrações encontradas de etinilestradiol e estrogênios naturais em afluentes e efluentes das estações de tratamento de águas residuais, com o fato de que bactérias no esgoto e no lodo biológico, sobretudo *Escherichia Coli*, poderiam desfazer a reação de conjugação, regenerando-os em sua forma ativa.

Também é documentado que a conjugação glicurônica dessas substâncias gera um produto com menor persistência ambiental, apresentando uma degradação biológica mais facilitada que o estrogênio conjugado a sulfato³⁹.

O 17-β estradiol sofre metabolização, sobretudo hepática, gerando a estrona, por oxidação. A estrona pode ser biotransformada em estriol, sendo este último o principal

estrogênio excretado em mulheres grávidas⁴⁰ e que apresenta menor atividade estrogênica entre os hormônios naturais⁴¹.

Na tabela 1 abaixo, foi realizada uma estimativa das médias diárias per capita de excreção dos hormônios naturais e do 17- α Etinilestradiol na espécie humana, sendo possível notar que mulheres grávidas eliminam grandes quantidades de hormônios naturais⁴⁰.

Tabela 1: Estimativa da excreção diária *per capita* de estrogênios na espécie humana⁴⁰

Categoria	Excreção diária (em $\mu\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$)			
	17- α Etinilestradiol	Estriol	Estrona	17- β estradiol
Homens	-	1,5	3,9	1,6
Mulheres Grávidas	-	6000	600	259
Mulheres em fase de menstruação	-	4,8	8,0	3,5
Mulheres na Menopausa	-	2,3	4,0	1
Mulheres usuárias de 17- α Etinilestradiol em terapia de reposição hormonal ou como anticoncepcional oral	7,15 a 9,10	-	-	-

2.3.2 – Mecanismo de Ação dos estrogênios naturais e do 17 α -etinilestradiol

O mecanismo de ação das 4 substâncias é similar, interagindo de forma agonista com receptores estrogênicos ER α e ER β , presentes no citoplasma celular.

Após a interação no citoplasma, o complexo receptor-ligante gera uma modificação de conformação do receptor, que é capaz de interagir com regiões promotoras do DNA, que passa a sintetizar mRNA. Então, ocorre a tradução produzindo proteínas específicas, que agem no metabolismo celular^{42,43}.

Alguns dos principais alvos dos estrogênios incluem células do trato reprodutivo feminino, as células mamárias, ósseas, hepáticas e células do hipotálamo e pituitária¹².

2.3.3 – Características farmacodinâmicas e efeitos no uso clínico

Em relação a características farmacodinâmicas, tem-se que o 17- β estradiol é considerado o mais forte estrogênio endógeno, sendo considerado um padrão ao qual se compara outras substâncias em testes de atividade estrogênica^{44,45}.

Na espécie humana, o 17-β estradiol está envolvido no crescimento de tecidos de órgãos reprodutivos femininos, no desenvolvimento dos seios e características sexuais secundárias nas mulheres, na estabilização e fortalecimento da matriz óssea, entre outros efeitos¹¹.

O 17-β estradiol, assim como o estriol e estrona, pode ser usado em terapia de reposição hormonal bioidêntica, sobretudo no tratamento de sintomas da menopausa.

Seus outros usos clínicos incluem o tratamento de hipoestrogenismo, o tratamento de infertilidade feminina, e como paliativo na terapia de câncer de mama e de próstata andrógeno-dependente^{46,47}. No entanto, o 17-β estradiol, assim como o 17-α Etinilestradiol, estão enquadrados pela Agência Internacional de pesquisa sobre o Câncer (IARC) no grupo I, sendo considerados carcinógenos para humanos⁴⁸.

Já a estrona tem seu uso principalmente na profilaxia da osteoporose na pós menopausa em mulheres aos quais outros medicamentos não são apropriados¹².

O 17-α Etinilestradiol é normalmente utilizado em doses entre 10 a 50 µg em medicamentos anticoncepcionais orais (conjuntamente com progestogênios) e seus demais usos clínicos incluem tratamento de sintomas da perimenopausa, da obstrução mamária pós-parto, no sangramento uterino, na terapia hormonal para mulheres com hipogonadismo, e na terapia paliativa para carcinoma maligno de próstata e mama⁴⁹.

Esse estrogênio sintético também está relacionado a síndrome de Disgenesia Testicular, em virtude da exposição materna no período fetal, já que o etinilestradiol consegue atravessar a barreira placentária atingindo o feto⁵⁰.

O uso de anticoncepcionais orais, incluindo um componente estrogênico, geralmente o 17-α Etinilestradiol, e um progestogênico é suspeito de estar relacionado a efeitos adversos tais como aumento da pressão arterial⁵¹, aumento da incidência de cálculos biliares⁵² e menor sensibilidade à glicose⁵³.

2.3.4 – Difusão no ambiente e Concentrações relatadas na literatura científica

Os estrogênios naturais e o 17-α etinilestradiol estão largamente difundidos no ambiente. Enquanto que a estrona, o estriol e o 17-β estradiol são eliminados, em baixíssimas concentrações, como produto de excreção de animais vertebrados presentes na biota aquática, o 17-α etinilestradiol é antropogênico, não existindo naturalmente nos corpos hídricos. A presença deste contaminante sintético, então, está relacionada com atividades humanas.

As concentrações encontradas dessas substâncias em diferentes corpos hídricos estão relacionadas com as suas entradas contínuas através de efluentes da indústria

farmacêutica e pelo esgoto humano, lançado com ou sem tratamento convencional, permitindo sua difusão nas águas superficiais, subterrâneas e até na água potável ⁵⁴.

Essas substâncias também podem ser encontrada em sedimentos marinhos³⁴ e no lodo de estações de tratamento de efluente utilizado como fertilizante na agricultura, podendo promover uma contaminação do solo⁵⁵ e em mangues⁵⁶.

A detecção de 17- α etinilestradiol em rios próximos a grandes áreas rurais de criação de animais indica que, embora seja ilegal em muitos países, este composto é utilizado como fator de crescimento. Este fato é agravado pela a própria excreção natural de estriol, estrona e 17- β estradiol dos animais⁵⁷.

As tabela 2 e 3⁵⁸ mostram as faixas de concentração dos estrogênios em matrizes aquáticas no Brasil e em diversos locais no mundo. É observado que as substâncias estão presente em concentrações na faixa de ng.L⁻¹.

Observando a tabela 3, é possível destacar um estudo realizado na Alemanha⁵⁹, que encontrou estrona, 17- β estradiol e 17- α etinilestradiol em estações de tratamento de efluentes (ETE), em águas superficiais e na água de consumo humano na Alemanha.

Já entre os estudos no Brasil, é possível destacar um estudo⁶⁰ que encontrou altas concentrações de estrogênios tanto em esgoto doméstico quanto na água dos rios (mananciais) e na água para consumo humano nas cidades de Campinas e Sumaré, ambas no estado de São Paulo.

Tabela 2: Concentrações médias encontradas de estrogênios em diferentes matrizes e locais no Brasil.

Matriz	Local	EE2 (em ng.L ⁻¹)	E1 (em ng.L ⁻¹)	E3 (em ng.L ⁻¹)	E2 (em ng.L ⁻¹)	Referencia
Água de consume humano	Campinas-SP e	275 e 472	0,10 e	0,70 e	0,92 e	60
	Sumaré – SP		0,08	0,62	1,30	
Água de Rio	Campinas e	444 e 786	14,18 e	3,39 e	5,46 e	60
	Sumaré – SP		1,02	4,12	6,40	
Esgoto Doméstico	ETE Penha – RJ	6,0	40,0	Não pesquisado	20,0	2

Continuação Tabela 2

Matriz	Local	EE2 (em ng.L ⁻¹)	E1 (em ng.L ⁻¹)	E3 (em ng.L ⁻¹)	E2 (em ng.L ⁻¹)	Referencia
Água de consumo humano	Seropédica – RJ	Não detectado	Não detectado	1.00 a 7.27	Não detectado	61
Água Potável	São Luiz – MA	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Não detectado	62

Legenda: EE2 = 17- α etinilestradiol, E2 = 17- β estradiol, E1 = Estrona, E3 = estriol.

Tabela 3: Concentrações relatadas de 17 α -Etinilestradiol em matrizes aquáticas no mundo⁵⁸.

Local	EE2 (em ng.L ⁻¹)	E1 (em ng.L ⁻¹)	E2 (em ng.L ⁻¹)	E3 (em ng.L ⁻¹)	Referência
ETE - Itália	3,0 (afluente) e 0,4 (efluente tratado)	52,0 (afluente)	12,0 (afluente) e 1,0 (efluente tratado)	80,0 (afluente)	37
ETE França	4,9 a 7,1 (afluente) e 2,7 a 4,5 (efluente tratado)	9,6 a 17,6 (afluente) e 4,3 a 7,2 (efluente tratado)	11,1 a 17,4 (afluente) e 4,5 a 8,6 (efluente tratado)	11,4 a 15,2 (afluente) e 5,0 a 7,3 (efluente tratado)	63
ETE Inglaterra	Não Detectado	6,4 a 29,0	1,6 a 7,4	2,0 a 4,0	64
ETE Alemanha	Efluente tratado: 0,1 a 8,9	0,35 a 18,0	0,15 a 5,2	0,1 a 8,9	59

Continuação Tabela 3

Local	EE2 (em ng.L ⁻¹)	E1 (em ng.L ⁻¹)	E2 (em ng.L ⁻¹)	E3 (em ng.L ⁻¹)	Referência
Águas Superficiais e Água de consumo humano – Alemanha	0,10 a 5,1 (água superficial) 0,15 a 0,50 (água de consumo humano)	0,10 a 4,1 (água superficial) 0,20 a 0,60 (água de consumo humano)	0,15 a 3,6 (água superficial) 0,20 a 2,1 (água de consumo humano)	Não analisado	59
Águas superficiais - França	1,1 a 2,9	1,1 a 3,0	1,4 a 3,0	1,0 a 2,5	63

Legenda: EE2 = 17- α etinilestradiol, E2 = 17- β estradiol, E1 = Estrona, E3 = estriol.

2.3.5 – Efeitos Ambientais e na saúde humana

O 17 α -etinilestradiol, possui um alto potencial estrogênico *in vitro*⁶⁵, com potência e estabilidade em água superior aos estrogênios naturais⁶⁶.

É apontado que essa substância, em conjunto com os hormônios naturais, seriam responsáveis pela maior parte da atividade estrogênica em efluentes de ETE no Reino Unido 9 e que o 17- α etinilestradiol seria o mais potente interferente endócrino para peixes⁶⁷.

Outro estudo⁶⁸ mostra que, na concentração de 0,1 ng.L⁻¹, o 17 α -etinilestradiol seria capaz de estimular a expressão da vitelogenina em peixes. Já na faixa de concentração entre 0,1 a 15 ng.L⁻¹, poderia interferir na diferenciação sexual e na faixa de concentração de 2 a 10 ng.L⁻¹ haveria indícios de prejuízo a fecundidade.

O efeito de exposições crônicas ao 17 α -etinilestradiol, em concentração de 5 ng.L⁻¹ também poderia trazer prejuízos na fecundidade da prole dos peixes⁶⁹.

A descrição dos efeitos em animais relatados na literatura causados pela exposição ao 17 α -etinilestradiol e estrogênios naturais está contida nos quadros 1 e 2²³. É possível notar que essas substâncias estão envolvidas em diversos efeitos adversos ao sistema reprodutivo, podendo levar até ao aumento de mortalidade da espécie⁷⁰.

Para o 17- β estradiol, sua capacidade de feminizar peixes já se produziria em concentrações de 1 a 10 ng.L⁻¹, com redução da fecundidade de espécies fêmeas de

peixes⁷¹. É relatado inclusive que este estrogênio poderia impactar até mesmo o crescimento e desenvolvimento de plantas³⁴.

Existem estudos que mostram efeitos aditivos e sinérgicos envolvendo essas substâncias, resultando em um aumento da atividade estrogênica, o que poderia tornar ainda mais preocupante a presença desses contaminantes no ambiente. O efeito aditivo entre o 17 α -etinilestradiol e 17- β estradiol foi relatado em ensaio *in vitro* YES⁷² em mistura de substâncias contendo 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, nonilfenol, octilfenol e bisfenol A em ensaio *in vivo* de indução de vitelogenina em peixes machos⁷³.

Já os efeitos sinérgicos são relatados, em teste YES, na combinação das substâncias 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, nonilfenol e bisfenol A⁷².

Quadro 1 – Principais efeitos da estrona e 17- α etinilestradiol em diferentes espécies animais²³.

17-A ETINILESTRADIOL		
Ação	Espécie	Fonte
Estimulação de Vitelogenina	Diversas espécies de Peixes de água salgada e água doce	70, 74, 75
Aumento da Mortalidade da espécie	Peixe de água Doce (<i>Pimephales promelas</i>)	70
Diminuição da reprodução	Peixe de água Doce (<i>Pomatoschistus minutus</i>)	76
Retardo do crescimento e diminuição da reprodução	Ratos Machos (<i>Rattus norvegicus</i>)	77
Alteração da proporção entre sexos	Peixe de água Doce (<i>Pimephales promelas</i>)	78
Infertilidade e Redução da Fecundidade	Peixe de água doce (<i>Danio rerio</i>)	69
ESTRONA		
Ação	Espécie	Referência
Estimulação da produção de Vitelogenina	Peixes	79, 71
Inibição do desenvolvimento de testículos		79

Quadro 2 – Principais Efeitos do 17- β estradiol em diferentes espécies animais²³.

17-β ESTRADIOL		
Ação	Espécie	Referência
Estimulação a produção de Vitelogenina e interferência na produção de ovos.	Tartaruga	80
Feminização de peixes	Peixes	81, 82, 83
Modificação nas gônadas		84
Indução de Hermafroditismo		85, 82
Feminização de espécies macho		86
Diminuição da reprodução		87, 82
Inibição do desenvolvimento de testículos		79
Aumento da mortalidade da prole		83
Estimulação a produção de Vitelogenina		84, 88, 71, 74

Em relação ao estabelecimento de concentrações de exposição segura dos 3 estrogênios (17- α etinilestradiol, 17- β estradiol e estrona), ainda não há um consenso. A Agência Ambiental da Inglaterra e Gales, em uma revisão bibliográfica sobre os estrogênios naturais e o 17 α -etinilestradiol, concluiu que a concentração prevista em que não se observariam efeitos (PNEC) desses estrogênios na biota marinha e de água doce seria de 0,1 ng.L⁻¹ para 17- α etinilestradiol, 1,0 ng.L⁻¹ para 17- β estradiol e entre 3,0 e 5,0 ng.L⁻¹ para estrona⁸⁹.

Um estudo⁹⁰ que divergiu desses valores de PNEC estabeleceu, a partir de revisão de dados de concentração em que não se observa efeitos reprodutivos de 26 espécies em 39 publicações, que a PNEC para 17- α etinilestradiol seria de 0,35 ng.L⁻¹.

Em relação aos desfechos associados a exposição humana do 17- α etinilestradiol e estrogênios naturais por fontes ambientais, estes ainda não estão totalmente elucidados.

E virtude da enorme gama de substâncias químicas que se está exposto no cotidiano e a ausência de estudos de experimentação em humanos (por óbvios motivos éticos), torna-se difícil elucidar claramente a associação da exposição a uma única substância (ou de um pequeno número de substâncias) com um determinado desfecho.

Para estabelecer-se uma associação causal entre um determinado desfecho e uma exposição são necessários⁹¹:

- Associação matemática exposição-desfecho, com significância estatística, em estudos epidemiológicos bem delineados, com o controle de variáveis de confundimento e evitando, o quanto for possível, os vieses.
- Consistência dos resultados, devendo haver similaridade entre os resultados encontrados nos diferentes estudos científicos.
- Plausibilidade biológica, que demonstre o mecanismo fisiopatológico relacionando o agente químico e seu efeito no surgimento da patologia.
- Estabelecimento de uma sequência temporal, que assegure que a exposição vem antes do desfecho e que quanto maior a exposição, maior será a probabilidade de ocorrência e magnitude desse desfecho

As principais suspeitas de desfechos são a infertilidade masculina⁷⁷ e distúrbios de crescimento em crianças⁹².

Os grupos mais suscetíveis a exposição seriam os pré-adolescentes masculinos (cuja produção endógena de estrogênios situa-se em $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$) e as mulheres pós menopausa^{92, 77}.

Estudos de avaliação de risco a saúde humana para 17α -etinilestradiol e estrogênios naturais provenientes de fontes ambientais, concluem que a exposição seria insuficiente para produzir danos à saúde humana^{93, 94, 95}.

No entanto, questiona-se o efeito aditivo da exposição desses 3 contaminantes (17α -etinilestradiol, estrona e $17\text{-}\beta$ estradiol) com outras substâncias com atividade estrogênica presentes no ambiente, em uma exposição crônica e precoce a múltiplos interferentes endócrinos estrogênicos⁷⁷.

2.4 – Principais metodologias laboratoriais para caracterização da atividade estrogênica, e identificação química das 3 substâncias (estrona, 17-β estradiol e 17-α etinilestradiol) em matrizes ambientais

Diferentes metodologias são disponíveis para a caracterização da atividade estrogênica, identificação e quantificação química das 3 substâncias de estudo (estrona, 17-β estradiol e 17-α etinilestradiol) em uma matriz ambiental (sobretudo aquática), existindo ensaios *in vivo*, *in vitro* e métodos químicos disponíveis.

Entre os ensaios *in vivo*, é possível destacar os ensaios com uso de roedores e os realizados com peixes^{96, 70}. Nos ensaios em peixes, é mensurada a capacidade da substância (ou da mistura de substâncias em determinada concentração ou mesmo de um efluente) de induzir a síntese de vitelogenina em peixes machos⁷⁰

A vitelogenina é uma proteína presente na circulação sistêmica em espécies de animais ovíparos, estando em concentrações baixas nas espécies macho e alta nas fêmeas, e sua função está relacionada à maturação dos óvulos⁸⁰.

A expressão do gene de vitelogenina está relacionada às concentrações de estrogênios no organismo e por isso se consideram os níveis de vitelogenina como um marcador de feminização de peixes e de exposição a substâncias interferentes endócrinas estrogênicas⁹⁷.

A mensuração da vitelogenina é normalmente realizada por radioimunoensaio ou por imunoensaio enzimático (ELISA).

Já o ensaio *in vivo* com roedores é capaz de mensurar as modificações da massa uterina de roedores (ensaio uterotrófico) ou então detectar alterações na histologia de células do epitélio da mucosa vaginal (ensaio de cornificação da mucosa vaginal). Seu uso é menos difundido, em virtude dos problemas éticos do uso de animais e do elevado custo em comparação com outros ensaios⁹⁶.

Em relação aos ensaios *in vitro*, os principais são o teste YES (sigla para “Yeast Estrogen Screen”), o teste de ligação competitiva nos receptores de estrogênio e o teste E-Screen.

No teste YES, é utilizado uma levedura de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada, ao qual em seu genoma foi adicionada uma sequência de DNA do receptor de estrogênio humano⁴⁵. Com isso, esse teste é capaz de analisar a atividade estrogênica da substância, ou seja, a capacidade que a substância possui em interagir com o receptor de estrogênio humano e produzir uma resposta.

A mensuração no ensaio YES é colorimétrica, por espectrofotometria, ao qual a enzima β-galactosidase, formada de acordo com a atividade estrogênica da substância

(ou mistura de substâncias), cliva gerando uma mudança de cor de amarelo para vermelho do agente cromogênico clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosida, presente no meio de análise. Os resultados obtidos neste ensaio são comparados aos do padrão de 17 β -estradiol, sendo os resultados expressos em concentração equivalente de 17 β -estradiol⁴⁵.

O ensaio E-Screen fundamenta-se no efeito de multiplicação de células de carcinoma mamário humano MCF-7 estimulado pela exposição a substâncias com atividade estrogênica. Neste ensaio utiliza-se um soro, inserido no meio de análise para inibir a replicação das células MCF-7. As substâncias com atividade estrogênica seriam capazes de anular esse efeito inibitório e estimular a proliferação dessas células tumorais⁴⁴.

O período de incubação das células é de 4 a 6 dias, sendo realizado na presença e na ausência da substância padrão (17 β -estradiol) e da amostra em teste. A mensuração da proliferação celular pode ser feita através de contagem do número de células ou núcleos⁴⁴ ou por método colorimétrico⁹⁸.

No teste de ligação competitiva aos receptores de estrogênio é analisada a capacidade da substância em teste disputar com o padrão de estrogênio (no caso, usa-se o 17 β -estradiol radiomarcado) a ligação com os receptores estrogênicos, sendo os resultados mensurados com o auxílio de um cintilador líquido.

Um interessante estudo⁹⁹ submeteu as mesmas substâncias-teste a ensaios *in vitro* e *in vivo*, sendo observado que as substâncias apresentam maior potência *in vivo* que *in vitro*, explicitando a dificuldade dos ensaios *in vitro* de emular completamente as condições *in vivo*.

Nos ensaios por métodos químicos analíticos (em metodologias cromatográficas, por exemplo), muitas vezes não se mensura a atividade ou o efeito biológico da(s) substâncias, porém é permitido identificar e quantificar as concentrações das espécies químicas em uma matriz ambiental complexa e de componentes desconhecidos.

As metodologias químicas utilizadas para analisar interferentes endócrinos (como o 17 α -etinilestradiol) devem ser capazes de detectar essas substâncias, presentes normalmente em concentrações baixas em matrizes ambientais aquáticas, numa faixa de $\mu\text{g.L}^{-1}$ (microgramas por litro) ou mesmo ng.L^{-1} (nanogramas por litro).

Essas metodologias englobam uma etapa preliminar de extração (sendo a extração em fase sólida a mais utilizada) e a determinação através de cromatografia líquida ou a gás (usando ou não a derivatização), normalmente acoplada a um detector de espectrômetro de massas¹⁰⁰.

Na cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas, é necessário que os analitos de interesse sejam volatilizados. Como os 3 estrogênios escolhidos (estrone, 17-β estradiol e 17-α etinilestradiol) são substâncias de grande massa molecular, com a presença de fortes grupos polares, a análise direta dos estrogênios por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massa (GC-MS) é dificultada, havendo a necessidade de uma reação prévia de derivatização das substâncias¹.

Essa derivatização ocorre através de uma reação de silanização ao qual se substitui o hidrogênio ácido (presente nas hidroxilas dos estrogênios), sendo necessário reagentes derivatizantes tais como o BSTFA (N,O – bistrimetilsililtrifluoracetamida), sozinho ou em mistura com o adjuvante de derivatização TMCS (triclorometilsilano).

O BSTFA é vastamente utilizado em análises de estrogênios devido à grande reatividade desse derivatizante com compostos que apresentem hidroxila. O BSTFA também apresenta como características uma considerável volatilidade (proporcionando uma não co-eluição dos picos iniciais), baixa degradação por altas temperaturas, e aceitável solubilidade em solventes orgânicos comuns¹⁰¹.

Além de métodos cromatográficos, são muito utilizados para análise de estrogênios em matrizes ambientais os ensaios imunoenzimáticos, fundamentados no princípio da interação específica entre um antígeno e um anticorpo, sendo este último a substância de interesse (ou a mistura delas) presente na matriz ambiental.

As metodologias cromatográficas e as por imunoensaio são normalmente precedidos por uma etapa preliminar de filtração e extração, visando uma purificação e pré-concentração da amostra ambiental¹⁰², e um dos principais métodos imunoenzimáticos utilizados para determinação de estrogênios é o ensaio de imunoadsorção enzimática, também chamado de teste ELISA.

O teste ELISA pode ser policlonal ou monoclonal. No policlonal, detecta-se o 17-α etinilestradiol em conjunto com outras (normalmente os estrogênios naturais), não sendo capaz de caracterizar individualmente a concentração de cada uma das substâncias desse grupo presentes na amostra

Já o teste ELISA monoclonal é altamente específico, detectando uma única substância ou espécie química, podendo ser usado quantitativamente e gerando resultados confiáveis e muitas vezes em concordância com análises cromatográficas¹⁰².

O teste ELISA monoclonal Abraxis Ecologiena™ para detecção e quantificação de 17-α etinilestradiol foi validado e aceito pela USEPA¹⁰³.

Esta metodologia é caracterizada como um teste ELISA competitivo indireto. Competitivo pois o 17-α etinilestradiol presente na amostra de urina compete com o 17-

α etinilestradiol conjugada à enzima peroxidase (presente na solução conjugada) pela ligação aos anticorpos monoclonais anti-17- α etinilestradiol, que por sua vez estão impregnados nos poços da microplaca.

É caracterizado também como indireto pois, na ausência ou em baixas concentrações do estrogênio na amostra (abaixo do limite de quantificação), a interação com os anticorpos será feita pelo 17- α etinilestradiol da solução conjugada, gerando a enzima na forma livre, capaz de interagir com o substrato tetrametilbenzidina, metabolizando-o e gerando cor azul, que se torna amarela pela adição da solução de parada (ácido sulfúrico diluído).

Assim, quanto maior a intensidade da cor produzida (medida a 450 nm em leitora ELISA) menor a concentração de 17- α etinilestradiol na amostra ambiental.

2.5 – Estabilidade das substâncias em matriz aquática ambiental

Em relação aos estudos de estabilidade, é relatado que os estrogênios na forma aquosa são degradados em presença de ar, aquecimento e de luz. A meia-vida dessas substâncias em amostras ambientais de rios ingleses foi de cerca de 10 dias sob condições de estocagem ideais, tais como armazenagem em refrigeração a 4°C, protegido da luz e do ar⁶⁷.

2.6 – Parâmetros Físico Químicos e características de eutrofização de amostras aquáticas ambientais

Embora não seja o objetivo principal deste trabalho, foram analisados os parâmetros físico químicos, tais como análises de oxigênio dissolvido (OD) condutividade, pH, sólidos totais dissolvidos (STD), salinidade e temperatura, nitrogênio e fósforo totais e demanda química de oxigênio (DQO), são informações importantes para um diagnóstico da qualidade da água, assim como podem mostrar características de eutrofização dos afluentes da lagoa de Araruama em estudo.

É relatado que grandes volumes de matéria orgânica e de substâncias como carbono, nitrogênio e fósforo, provenientes muitas vezes de esgoto sanitário, industrial ou de fertilizantes agrícolas, se constituem como fatores relacionados a poluição das águas¹⁰⁴.

Níveis elevados destes nutrientes possibilitam a proliferação de bactérias heterotróficas e de algas, promovendo diminuição da concentração de oxigênio dissolvido e impactando na biota aquática residente^{105, 106}.

As análises de nitrogênio total englobam espécies químicas contendo nitrogênio orgânico, nitrato, amônia, nitrito e formas gasosas que possam estar dissolvidas no meio líquido. Já as análises de fósforo englobam fósforo inorgânico (geralmente ortofosfato) e fósforo orgânico.

3 – OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

- Identificar e quantificar os estrogênios (17- α etinilestradiol, estrona e 17 β -estradiol) em amostras de 5 afluentes específicos da Lagoa de Araruama-RJ, sendo que esses afluentes são constituídos e fortemente influenciados por efluentes tratados das Estações de tratamento de Esgotos e Efluentes que circundam a Lagoa de Araruama.

3.2 - Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar a metodologia por Cromatografia a gás acoplada a detector de espectrometria de massas (GC-MS) para identificação e quantificação das substâncias em amostras de efluentes ambientais.

- Comparar a metodologia por GC-MS com o ensaio ELISA monoclonal no que tange a determinação das concentrações de 17- α etinilestradiol .

- Caracterização físico-químicas das amostras de afluentes em estudo.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Preparo das soluções dos padrões de estrogênio

4.1.1 - Metodologia por Imunoensaio enzimático com anticorpos monoclonais

A solução de branco e as soluções dos padrões de 17- α etinilestradiol nas concentrações 0,05, 0,15, 0,5 e 3,00 $\mu\text{g.l}^{-1}$ em metanol 10% já estavam prontas, vindas junto ao kit ELISA monoclonal Abraxis Ecologia adquirido.

Foi preparado 1 ml da solução padrão de 17- α etinilestradiol na concentração 1,50 $\mu\text{g.l}^{-1}$ por diluição 1:1 de um volume de 500 μL da solução 3,00 $\mu\text{g.l}^{-1}$ com metanol diluído (metanol:água 10:90 v/v) utilizando-se pipeta automática e vial âmbar de 2 ml.

4.1.2 – Metodologia por Cromatografia a gás acoplada a Espectrometro de Massas

Foi pesado, separadamente e em bécher de 10 ml, 10 mg de cada um dos padrões analíticos dos 3 estrogênios (estrone, 17- α etinilestradiol e 17 β -estradiol) com auxílio de balança analítica Metler Ae200. Esses 3 padrões foram adquiridos junto ao fabricante Sigma-Aldrich.

A massa pesada foi diluída em acetona (grau GC, fabricante Tedia) e transferida para balões volumétricos de 50 ml individuais para cada estrogênio, previamente identificados, gerando solução 200 mg.L⁻¹ para cada um dos estrogênios. Alíquotas de 0,5 ml foram retiradas, com auxílio de pipeta automática, de cada uma das soluções para se preparar uma solução com a mistura dos 3 estrogênios na concentração de 2 mg.L⁻¹ em balão volumétrico de 50 ml, que foi avolumado com acetona.

Esta solução de 2 mg.L⁻¹ da mistura de estrogênios foi sucessivamente diluída em balões volumétricos de 50 ml com mistura de acetona e hexano 1:1 (ambos grau GC, fabricante Tedia), usando fator de diluição máximo de 1:100 até se chegar as soluções de trabalho.

Essas soluções são usadas nas concentrações 12,500, 9,375, 6,250, 3,125 e 1,875 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (aos quais são retiradas alíquotas de 4 ml para elaboração de curva de calibração em solvente e para ensaios de recuperação na matriz de afluente, sendo neste caso avolumado para 500 mL com amostra de matriz de afluente) e nas concentrações 50,000, 37,500, 25,000, 12,500 e 7,500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (aos quais são retiradas alíquotas de 1 ml e avolumadas com 3 ml de matriz do afluente para elaboração da curva de calibração na matriz).

4.2 – Metodologia para análise por Cromatografia a gás acoplada ao Espectrômetro de Massas.

4.2.1 – Otimização das condições da reação de derivatização

A reação de derivatização é considerada como uma das etapas mais importantes na análise de estrogênios por GC-MS.

Muitos estudos que analisam estrogênios via GC-MS usam temperaturas de derivatização de 60°C^{23, 107} ou 70°C¹⁰⁸ havendo também estudos que usam derivatização em forno de microondas aplicando altas potências por curtos períodos de tempo¹⁰⁹.

Com intuito de obter o melhor rendimento da reação, foram testadas 4 condições distintas de derivatização, utilizando 3 replicatas de cada condição na solução do mix de padrões contendo os 3 estrogênios à 1,00 $\mu\text{g.L}^{-1}$:

- Metodologia A: a mistura de estrogênios foi submetida à derivatização em uma temperatura de 60°C sem uma etapa de pré derivatização em micro-ondas Consul CMS18C 110V.

- Metodologia B: a mistura de estrogênios foi submetida à derivatização em uma temperatura de 60°C havendo uma etapa de pré derivatização em micro-ondas por 1 minuto à potência de 700W.

- Metodologia C: a mistura de estrogênios foi submetida à derivatização em uma temperatura de 70°C sem uma etapa de pré derivatização em microondas

- Metodologia D: a mistura de estrogênios é submetida à derivatização em uma temperatura de 70°C havendo uma etapa de pré derivatização em micro-ondas por 1 minuto à potência de 700W.

4.2.2 – Otimização das condições para a extração em fase sólida (EFS)

Foram testadas 3 condições de extração, com a amostra ambiental dopada com os estrogênios na concentração 0,75 µg.mL⁻¹. Na primeira condição, (método A), foi usada a mesma metodologia aplicada no ensaio ELISA monoclonal:

1) Pré condicionamento do cartucho C18 com 5 ml de metanol e depois com 10 ml de água destilada, com uma taxa de fluxo não superior a 20 ml por minuto. O fluxo foi calculado, com auxílio de cronometro de relógio, através de contagem do número de gotas em 15 segundos, multiplicando por 4 (uma vez que o fluxo é para 1 minuto) e considerando cada gota tendo volume de 0,05 mL.

2) 500 ml da amostra com pH entre 5 e 8 é passado através do cartucho, com uma taxa de fluxo não superior a 20 ml por minuto

3) Lavagem do cartucho com 5 ml de água destilada (fluxo até 20 ml por minuto), seguido de secagem o cartucho

4) Lavagem do cartucho com 5 ml de hexano (fluxo até 20 ml por minuto).

5) Eluição do analito com 5 ml de diclorometano com fluxo de até 3 ml/minuto

Na segunda condição, o método B¹⁰⁷ foi utilizado :

1) Condicionamento do cartucho C18 com 10 ml de hexano, acetona, metanol e água ultrapura (nesta ordem), com fluxo de 8 mL por minuto

2) Passagem de 500 ml da amostra, estando a mesma em pH ácido (cerca de pH 3), sobre o cartucho, com fluxo de 8 mL por minuto

3) Eluição com 4 ml da mistura 1:1 de acetona e hexano, fluxo de 4 ml por minuto.

Na terceira condição, o método C²³, foi utilizado:

- 1) Condicionamento do cartucho C18 com 3 x 2 ml de hexano, 1 x 2 ml de acetona, 3 x 2 ml de metanol e 5 x 2 ml de água em pH 3 (nesta ordem), com fluxo de 4 mL por minuto
- 2) Passagem de 500 ml amostra, estando a mesma em pH ácido, sobre o cartucho, com fluxo de 10 mL por minuto
- 3) Eluição com 2 vezes 2 ml de acetona, fluxo de 6 ml por minuto.

4.2.3 - Relação massa/carga dos estrogênios analisados

A partir da biblioteca NIST, contida no software do espectrômetro de massas Agilent 5973N, foram identificados os íons de fragmentação dos estrogênios silanizados. Os fragmentos utilizados para quantificação neste trabalho foram aqueles que obtiveram maior abundância relativa.

- 17- α etinilestradiol - derivado dissustituído: m/z 285 (fragmento usado para quantificação). Já os fragmentos 425 e 196 foram usados na identificação da substância.

- Estrona: m/z 342 (fragmento usado para quantificação). Já os fragmentos 218 e 257 foram usados na identificação do composto.

- 17- β estradiol: m/z 285 (fragmento usado para quantificação). Já os fragmentos 416 e 232 foram usados na identificação da substância.

4.2.4 - Condições cromatográficas e método de detecção

As amostras de solução padrão de cada um dos estrogênios (dissolvidas em solvente e na concentração 1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram, primeiramente, submetidas ao método de detecção por Scan, com varredura de 45 a 600 m/z. Com isso, foram obtidos os fragmentos característicos de cada um dos estrogênios (que foram comparando com os dados disponibilizados na biblioteca NIST) e os seus respectivos tempos de retenção.

Com os fragmentos e tempos de retenção conhecidos, foi estabelecido o método de detecção por monitoramento de íon seletivo com janela de absorção, permitindo buscar, numa amostra complexa, apenas os íons com massa/carga específicos desejados e nos tempos de retenção esperados.

As condições de análise no sistema CG-MS estão expostas no quadro 3²³.

Quadro 3: Condições estabelecidas na metodologia CG-MS²³.

	Parâmetros	Taxa (°C min ⁻¹)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Programação de Temperatura	Temperatura do Injetor	-	290	-
	Temperatura do Detector	-	300	-
	Temperatura da Coluna	-	50	-
		30	150	-
		10	300	5
Gás de Arraste	Hélio			
Vazão do gás de Arraste	1,22 ml.min ⁻¹			
Velocidade linear do Gás de Arraste	40 cm.s ⁻¹			
Volume de injeção	0,5 µL			
Pressão na Coluna	65 KPa			
Método de injeção	Splitless			
Continuação Quadro 3				
Coluna Utilizada	HP-5MS, com diâmetro interno de 0,25 mm, comprimento de 30 m e espessura de fase de 0,25 µm.			

4.2.5 - Validação das metodologias analíticas

4.2.5.1 – Validação da metodologia cromatográfica

Com intuito de se obter resultados com confiabilidade e adequados às exigências de qualidade pretendidas, é necessário elaborar procedimentos para validação das metodologias analíticas utilizadas.

Existem diferentes organismos nacionais ou internacionais que estipulam diretrizes e orientações para a realização do processo de validação, estipulando parâmetros ou indicadores quantitativos de desempenho.

Alguns parâmetros importantes que visam estabelecer a reprodutibilidade dos métodos analíticos são a seletividade/especificidade, linearidade e faixa de trabalho e os limites de detecção e quantificação do método¹¹⁰.

O processo de validação utilizado neste trabalho foi aplicado em um único laboratório (*in house validation*) e foi inspirado no guia do INMETRO intitulado “Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos - DOQ-CGCRE-008”¹¹¹.

4.2.5.1.1 – Seletividade e Especificidade

Este parâmetro mostra a capacidade que o método possui para identificar e quantificar os analitos de interesse corretamente em presença de interferentes, tais como produtos de degradação e outras substâncias com características parecidas às do analito e que podem modificar o sinal medido pelo equipamento.

Em um método GC-MS, este parâmetro é facilitado uma vez que o(s) analito(s) geram fragmentos específicos e característicos, geralmente documentados em literatura, facilmente reconhecíveis numa mistura complexa.

Existem diferentes testes para cálculo da seletividade. Como, para este tipo de análises (de estrogênios em matriz que mistura efluentes e água de lagoa salina) há a impossibilidade de se usar uma matriz certificada sem a presença dos analitos de interesse, a seletividade foi testada comparando-se os resultados mensurados, numa curva de adição padrão em diferentes concentrações, para a matriz fortificada e com os obtidos dos estrogênios dissolvidos em solvente.

Se, observando visualmente, as inclinações das curvas forem sobrepostas ou paralelas, o único efeito de matriz presente seria ocasionado a interferência natural em decorrência das concentrações basais do analito nas amostras¹¹¹.

4.2.5.1.2 – Linearidade

A linearidade se constitui como um parâmetro que correlaciona uma determinada concentração do analito de interesse e seu resultado correspondente, mensurado por um detector.

Com essa correlação estabelecida, é possível calcular a concentração do analito, previamente desconhecida, em uma determinada amostra.

A linearidade pode ser calculada por padronização interna ou externa e pode ser expressa por curva analítica, com o eixo x representando as concentrações de trabalho e o eixo y representando os resultados obtidos, gerando a equação de reta (1):

$$y = ax + b \text{ (equação 1)}$$

Ao qual:

y = resposta mensurada ou sinal analítico obtido. Variável dependente

x = concentração do analito de interesse. Variável independente

a = coeficiente angular (relacionando-se a sensibilidade). Mostra a inclinação da curva de calibração.

b = coeficiente linear. Está relacionado a intersecção da curva no eixo y quando x=0

O coeficiente de correlação linear (expresso pela letra “r”) é considerado um indicador adequado para avaliar o quanto pode ser adequada a reta obtida como modelo matemático que expresse a correlação entre variáveis de escala métrica.

Se r = 1, tem-se a correlação positiva perfeita entre as variáveis. Sendo r = -1, tem-se correlação negativa perfeita e caso r = 0, tem-se independência linear entre as variáveis, podendo haver correlações não lineares entre as variáveis.

Porém, antes de se avaliar o coeficiente de correlação, é necessário a verificação da ausência de dados aberrantes (através do uso do teste de Grubbs) e que haja homogeneidade da variância dos resíduos (homocedasticidade), através do teste de Levene¹¹¹.

No teste de Grubbs, é calculado o desvio de cada valor mensurado em relação à média¹¹². É usada a equação (2).

$$G = |x - x_{\text{medio}}| / S \text{ (equação 2)}$$

Sendo “S” o desvio padrão das medidas de uma determinada concentração

Um valor é considerado como aberrante quando valor G é superior ao valor crítico correspondente na tabela para n replicatas de determinada concentração em um intervalo de confiança (no caso, usou-se 95%)

O teste de Levene, ao qual é analisada a homogeneidade da variância dos resíduos, é promovida uma transformação dos dados originais, sendo executado o teste ANOVA aos dados transformados. Se o p-valor produzido for maior que o previamente estipulado (no caso, 0,05), conclui-se que há homocedasticidade.

4.2.5.1.3 – Faixa de trabalho

A faixa de trabalho do método possui uma concentração inferior e superior ao qual é possível quantificar o analito de interesse com segurança e confiabilidade.

Idealmente, a faixa deve englobar de 0 a 150% ou 50 a 150% da concentração que se espera obter do analito nas amostras naturais¹¹³.

Os métodos usados para quantificação em processo de validação envolvem padronização externa, adição padrão, padronização interna e superposição de matrizes¹¹³.

Neste trabalho, foi utilizada a adição padrão, ao qual foi elaborado uma curva analítica adicionando-se concentrações conhecidas dos 3 estrogênios em matriz da amostra de efluentes da região de estudo. Com isso, é diminuído o impacto dos efeitos de matriz

4.2.5.1.4 - Limite de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) é um parâmetro que indica a concentração mais baixa do analito que é passível de ser detectada (e distinguida do sinal de branco ou ruído com confiabilidade) por um método analítico.

O LD pode ser calculado a partir do banco da amostra não fortificado com o analito ou fortificando, sendo esta última condição escolhida por este trabalho. Então, o LD foi obtido a partir da curva de calibração, fazendo-se 7 replicatas na concentração mais baixa utilizada ($0,15 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A fórmula para obtenção do LD é mostrada abaixo nas equações (3) e (4)¹¹¹:

$$\text{LD} = [t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot S] \text{ (equação 3)}$$

Onde:

t = distribuição t de Student para $n-1$ replicatas, e com $1 - \alpha$ de grau de confiança.

S = desvio padrão das 7 replicatas na concentração mais baixa da amostra de branco fortificada com o analito.

A equação 3 pode ser simplificada, sendo 3,143 o valor de t de student tabelado utilizando o intervalo de confiança de 95% e 6 graus de liberdade, gerando a equação 4. O resultado gerado é então lançado na equação obtida na curva de calibração, sendo encontrado, ao final, a concentração em que se encontra o LD do método.

Como as amostra reais sofrem pré-concentração, divide-se a LD não corrigida pelo fator de concentração obtendo-se o LD do método para as amostras reais.

$$\text{LD} = 3,143 \cdot S \text{ (equação 4)}$$

Já o limite de quantificação é como um parâmetro que indica a concentração mais baixa do analito que pode ser quantificada. Este parâmetro pode ser matematicamente expresso pela multiplicação da média dos valores mensurados das 7 replicatas na concentração mais baixa da curva analítica multiplicado por 5 vezes o desvio padrão amostral das mesmas.

Como as amostras reais sofrem pré-concentração, divide-se a LQ do método pelo fator de concentração, obtendo-se o LQ do método para as amostras reais.

4.2.5.1.5 - Precisão

A precisão é um parâmetro que permite avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra ou de amostras semelhantes ou padrões sob condições determinadas¹¹¹.

Pode ser calculada através do desvio padrão (DP) ou desvio padrão relativo, também chamado de coeficiente de variação (cuja fórmula matemática está descrita na equação 5).

CV ou DPR% = (DP/CMD).100 (equação 5)

Onde:

DP = desvio padrão

CMD = concentração média determinada

Aceita-se um valor de até 20% de DPR em processos de validação de métodos analíticos de resíduos e impurezas, dependendo da complexidade da amostra¹¹³.

Outras formas de expressar a precisão incluem testes de repetitividade e de reprodutibilidade.

A repetitividade representa o nível de concordância entre os resultados de medições sucessivas de uma mesma amostra, efetuadas sob as mesmas condições de medição ou seja, usando o mesmo procedimento de medição, o mesmo analista, o mesmo equipamento, o mesmo local e com repetições em curto espaço de tempo¹¹¹.

A repetitividade pode ser calculada através do cálculo do limite de repetitividade, conforme mostra a equação 6.

$$r = t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot \sqrt{2} \cdot S \text{ (equação 6)}$$

Onde:

r = limite de repetitividade

$t_{(n-1, 1-\alpha)}$ = valor da estatística t de Student para n-1 graus de liberdade no intervalo de confiança estabelecido

S = desvio padrão

Quando a diferença entre os valores das replicatas é maior que r, é promovido o descarte de algum dos valores, devendo ser substituído por outro (uma nova replicata).

Se o valor obtido com a nova replicata passa no teste, é feito o cálculo da média aritmética do conjunto de dados. Se este novo valor obtido ainda é aberrante, é calculada a mediana do conjunto de dados com este valor discrepante¹¹¹.

Em relação a reprodutibilidade, é possível expressá-la através do teste de precisão intermediária quando se empreende a validação de um método analítico usando um único laboratório, não realizando comparações interlaboratoriais.

A precisão intermediária, também chamada de reprodutibilidade interna, está relacionada às características de precisão quando avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas variando determinadas condições, tais como o analista, os equipamentos e o dia em que é feita as análises¹¹¹.

Neste trabalho, testou-se a precisão intermediária comparando-se os resultados entre analistas diferentes, analisando, em quintuplicata, amostra fortificada na concentração 0,50 µg.ml⁻¹.

Utilizou-se o teste *t* de Student para comparação das médias das áreas obtidas pelos analistas, com intervalo de confiança de 95% e 4 graus de liberdade, para verificar se havia diferença entre as médias obtidas entre os analistas. A fórmula de cálculo de *t* está explicitada nas equações 7 e 8 abaixo:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \text{ equação (7)}$$

Sendo:

\bar{x}_1 e \bar{x}_2 = médias das respostas dos analitos em amostras do analista 1 e do analista 2, respectivamente, na mesma faixa de concentração.

n_1 e n_2 – tamanho das amostras (número de replicatas) usados por cada analista.

S^2 – variância calculada pela equação (8):

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \text{ Equação (8)}$$

Se o *t* calculado a partir dos ensaios é menor que o *t* tabelado, é possível afirmar, com 95% de confiança, que não há diferença estatisticamente significativa entre analistas na execução do método.

4.2.5.1.6 – Robustez

A robustez de um método analítico está relacionada a sensibilidade que este apresenta diante de pequenas variações de condições de sua realização. Um método é robusto quando, mesmo com essas variações introduzidas, os resultados obtidos das

mensurações são bastante similares aos obtidos com as condições originais do método¹¹³.

Para determinar a robustez, é possível utilizar o teste de Youden. Neste teste, é possível não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações¹¹¹.

Foi elaborado um planejamento fatorial semelhante ao quadro 4, ao qual as condições normais das variáveis foram intituladas por letras maiúsculas A, B, C, e seus valores alternativos foram intitulados pelas correspondentes letras minúsculas a, b e c¹¹⁴.

Quadro 4 – Planejamento fatorial para avaliação de robustez de método analítico¹¹⁴.

Valor do fator	Combinação Ensaída							
A ou a	A	A	A	A	a	a	a	a
B ou b	B	B	b	b	B	B	b	b
C ou c	C	c	C	c	C	c	C	c
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

Com os resultados obtidos, o efeito de cada variável foi avaliado pela diferença entre a média dos resultados das 4 análises com letra maiúscula dividido por 4 e a média dos resultados das 4 análises com letra minúscula dividido por 4.

Tendo o desvio padrão entre os 8 resultados para cada variável, os valores de efeito superior ao desvio padrão multiplicado pela raiz quadrada de dois ($s\sqrt{2}$) foram julgados como significantes e, portanto, modificam os resultados analíticos¹¹⁵

4.2.5.1.7 – Tendência/Recuperação

O parâmetro tendência é um dos mais importantes dentro de um processo de validação de metodologias analíticas. Está intimamente relacionada a exatidão dos resultados, envolvendo a possibilidade de erros aleatórios e sistemáticos e, com isso, pode ser fonte de incertezas de medição¹¹³.

A utilização de materiais de referência certificados, elaboração de testes de comparação interlaboratorial e execução de ensaios de recuperação são processos comumente utilizados para avaliação de tendência¹¹¹.

Neste trabalho, mediante a impossibilidade de execução das 2 primeiras condições, foram empreendidos testes de recuperação fortificando a matriz da amostra em 3 concentrações diferentes (0.25, 0.75 e 1.00 $\mu\text{g.l}^{-1}$), cobrindo concentrações baixa, média e alta da faixa de trabalho.

A recuperação é expressa em %, sendo obtida pela equação matemática (9) a seguir:

$$\text{Recuperação (\%)} = [(C1 - C2) / C3] \cdot 100 \text{ (equação 9)}$$

Onde:

C1 = concentração da substância de interesse na amostra dopada

C2 = concentração da substância de interesse na amostra não dopada

C3 = concentração da substância de interesse adicionada na amostra dopada.

É relatado que uma das possíveis limitações deste procedimento reside no fato de que a(s) substância(s) de interesse adicionada não está necessariamente na mesma forma que a presente na amostra, podendo superestimar a recuperação¹¹¹.

4.2.6 – Testes de validação e aplicação da Metodologia por Cromatografia a gás acoplada ao Espectrômetro de Massa nas amostras reais

A amostra ambiental foi primeiramente filtrada com filtro de papel qualitativo SP Labor, sendo submetida posteriormente a uma nova filtração com filtro Milipore de tamanho de poro 0,8 μm .

A seguir, foi ajustado o pH da amostra com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio diluídos, para pH em torno de 3.

As amostras foram submetidas à extração em fase sólida (EFS), sendo usados cartuchos C18 500 mg 6ml Bakerbond, com auxílio de vácuo proporcionado pelo sistema Vacuum Manifold Phenomenex®, conforme mostrado na figura 2.



Figura 2 – Extração em Fase Sólida das amostras com auxílio de sistema Vacuum Manifold.

Após serem eluídos dos cartuchos em solvente orgânico (em tubo graduado de 10 ml), o extrato purificado e concentrado foi seco completamente em corrente de nitrogênio comercial da marca Air Product.

Pouco antes da secura completa do tubo contendo a amostra, foi utilizado 400 μL de uma mistura de acetona e hexano 1:1 para rinsar as paredes do tubo, com intuito de arrastá-los para o fundo e evitar perdas dos estrogênios.

As amostras secas foram solubilizadas novamente em 25 μL de piridina e 25 μL de BSTFA 99% - TMCS 1%. A piridina foi utilizada apenas para inibir a formação de derivado silanizado monossustituído do 17- α etinilestradiol, favorecendo a formação do derivado dissustituído desse estrogênio sintético¹¹⁶.

O tubo graduado tampado contendo a amostra foi submetido à vortex (modelo SP Labor Ap 56) por 5 segundos, visando homogeneização da mistura e em seguida foi promovida a etapa de derivatização dos estrogênios, através aquecimento da amostra em estufa por 30 minutos.

Após o tubo resfriar à temperatura ambiente, a amostra foi transferida para insert de 250 microlitros, contido em vial âmbar de 2 mL, sendo tampado e levado para análise em Cromatógrafo a Gás Agilent, modelo 6850, acoplado a detector de espectrômetro de massas Agilent, modelo 5973N.

As amostras reais foram analisadas em triplicata para cada ponto de coleta. Já a elaboração da curva de calibração foi realizada na matriz de efluente filtrada (mas não submetida a EFS) e também em solvente acetona:hexano 1:1 (para os testes de seletividade). Em ambas foi fortificada com a mistura dos 3 padrões em 5 concentrações diferentes (0,15 a 1,00 $\mu\text{g.L}^{-1}$), usando 4 replicatas para cada concentração, constituindo a faixa de linearidade do método.

O ensaio para elaboração da curva de calibração e os ensaios de robustez, precisão intermediária e repetitividade foram realizados em matriz ambiental fortificada, (que sofreu os 2 processos de filtração mas não foi submetida a EFS) enquanto que os testes de recuperação foram submetidas a extração em fase sólida.

As condições aplicadas ao teste de robustez, em que se avaliam modificações em 3 variáveis do método em amostra de afluente a 0,50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, estão descritas na tabela 4 abaixo:

Tabela 4: Variáveis e condições utilizadas no teste de robustez.

Variável	Condições Nominais	Condições alternativas
Temperatura de derivatização	60°C	70 °C
Condições de Secagem	Corrente de gás nitrogênio comercial	Estufa a 50°C
Temperatura do injetor	290°C	260°C

Em relação ao cálculo das concentrações na amostra real, estas sofrem pré-concentração e há perdas na extração. Por isso, concentração obtida em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da amostra concentrada e analisada no equipamento de CG-MS foi dividida pelo fator de concentração e pelo fator de correção do % de recuperação (o qual é obtido dividindo por 100 o % de recuperação do analito), sendo obtido a concentração dos estrogênios para as amostras reais.

4.3 – Metodologia para análise por Metodologia ELISA monoclonal

4.3.1 – Validação da Metodologia ELISA monoclonal

Sendo o Método ELISA monoclonal utilizado neste trabalho já validado pela USEPA¹⁰³, apenas os parâmetros precisão (através do desvio padrão, variância e desvio padrão relativo), linearidade (pela curva de calibração) e recuperação (pelos ensaios de recuperação) foram calculados.

4.3.2 – Aplicação da Metodologia por Imunoensaio enzimático com anticorpos monoclonais (ELISA)

As amostras, analisadas em triplicata para cada ponto de coleta, foram primeiramente filtradas com filtro de papel qualitativo SP Labor, sendo submetida posteriormente a uma nova filtração com filtro Milipore de tamanho de poro 0,8 micrômetros. O pH foi ajustado para estar na faixa compreendida entre pH 5 e 8, com auxílio de ácido sulfúrico ou hidróxido de sódio diluídos.

A seguir, as amostras foram submetidas a Extração em fase sólida (EFS) com cartucho C18 500 mg 6ml Bakerbond, sendo que quando se analisou os padrões de 17- α etinilestradiol em concentrações conhecidas, para elaboração da curva de calibração, estes não foram submetidos a filtração ou EFS.

As etapas da Extração em Fase Sólida foram as seguintes¹⁰³:

- 1) Rinsagem do cartucho de SPE C18 com 5 ml de metanol e depois com 10 ml de água destilada, com uma taxa de fluxo não superior a 20 ml por minuto. O fluxo foi calculado, com auxílio de cronometro de relógio, através de contagem do número de gotas em 15 segundos, multiplicando por 4 (uma vez que o fluxo é para 1 minuto) e considerando cada gota tendo volume de 0,05 mL.
- 2) Passagem da amostra (500 ml) através do cartucho, com fluxo não superior a 20 ml por minuto.
- 3) Lavagem do cartucho com 5 ml de água destilada (fluxo até 20 ml por minuto). Esperar secar o cartucho.
- 4) Lavagem do cartucho com 5 ml de hexano (grau GC, fabricante Tedia), com fluxo de até 20 ml por minuto.
- 5) Eluição do analito com 5 ml de diclorometano (grau PA, fabricante Vetec) com fluxo de até 3 ml por minuto
- 6) Evaporação o solvente com gás nitrogênio com intuito de secagem
- 7) Adição de 1 ml de metanol 100% para o resíduo e promover agitação em vortex SP Labor Ap-56.
- 8) Ajuste do conteúdo para 10% de metanol v/v pela adição de 9 ml de água destilada obtendo um volume total de 10 ml

Após a etapa de extração em fase sólida e de secagem em corrente de nitrogênio e ressuspensão em 1 mL de metanol 10% (fator de concentração de 1000 vezes), a amostra foi submetida então a análise por ELISA monoclonal.

As Etapas da Metodologia ELISA monoclonal foram¹⁰³:

- 1) Preparação das Soluções Padrão: Diluição 1:1 da solução padrão concentrada de $3,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ de 17α -etinilestradiol com auxílio da solução metanol:água 10% v/v, para obtenção da solução padrão deste estrogênio à $1,5 \mu\text{g.L}^{-1}$.

- 2) Preparação da Solução Conjugada: foi misturado o conjugado enzima-antígeno com 7 ml de solução tampão específica do kit.

- 3) Foi misturado 100 μL de solução de padrão de EE2 (ou da amostra ambiental) com 100 μL de solução conjugada em cada poço vazio da microplaca. Realizado em

triplicata para cada amostra ou concentração de solução padrão e em duplicata para amostras de branco. Cada poço foi coberto com parafilme e misturado com movimentos circulares por 30 segundos.

4) Etapa de Incubação: 100 μ L da solução obtida na etapa anterior foi transferida para poços de um microplaca cobertos com o anticorpo. Esta microplaca foi incubada durante 60 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C).

5) Diluição 1:5 da solução de lavagem concentrada com auxílio de água destilada

6) Três rinsagens dos poços cobertos com 300 μ L de solução de lavagem em cada rinsagem

7) 100 μ L do reagente de coloração foi colocado em cada um dos poços e incubado por 30 minutos. Após esse período, 100 μ L da solução de parada foram adicionados e se realizou a leitura da absorbância a 450 nm em leitora ELISA Asys Statfax 2600.

8) Pelos valores da absorbância mensurados e da concentração de cada padrão, foi elaborada uma Curva de Calibração usando-se o Log das absorbâncias no eixo Y e o log das concentrações no eixo X. A equação de reta resultante permite o cálculo da concentração do analito (17- α etinilestradiol) nas amostras reais.

A concentração obtida foi então dividida pelo fator de concentração e pelo fator de correção da extração (que representa o % de recuperação dividido por 100), sendo então obtida a concentração real do analito na amostra.

4.4 – Dados da área de Estudo

Em relação ao ecossistema escolhido para a pesquisa, foi proposto o estudo na Região dos Lagos do estado do Rio de Janeiro, pesquisando os estrogênios estrona, 17- β estradiol e 17- α etinilestradiol em afluentes da Lagoa de Araruama, principal corpo hídrico receptor de esgotos da região.

A Lagoa de Araruama é um ecossistema lagunar hipersalino de 220 km² de superfície, sendo localizada dentro de uma região hidrográfica que reúne a bacia da

lagoa de Araruama, as restingas de Massambaba e Cabo Frio e o acidente geográfico chamado de Cabo Frio¹⁰.

Ela banha os municípios de Saquarema, Araruama, Iguaba Grande, São Pedro da Aldeia, Arraial do Cabo e Cabo Frio. A tabela 5 mostra a evolução da população residente nesses municípios, evidenciando um aumento populacional de 40,04% em 10 anos¹¹⁷.

Tabela 5: Evolução da população residente nos municípios que circundam a lagoa de Araruama em 10 anos¹¹⁷.

Município	Ano 2000	Ano 2010
Cabo Frio	126.828	186.227
Araruama	82.803	112.008
São Pedro da Aldeia	63.227	87.875
Arraial do Cabo	23.877	27.715
Iguaba Grande	15.089	22.851
TOTAL	311.824	436.676

O sistema de tratamento de águas e saneamento dessa região foi privatizado no final da década de 1990 e início da década de 2000. A concessão para produção e distribuição de água potável e tratamento de esgotos nos municípios de Araruama, Saquarema e Silva Jardim ficou a cargo da companhia Águas de Juturnaíba. Os municípios de Búzios, Cabo Frio, Iguaba, São Pedro da Aldeia e Arraial do Cabo ficaram sob responsabilidade da empresa Prolagos. Todavia, para Arraial do Cabo o tratamento de esgoto e ações de saneamento ficaram sob responsabilidade da prefeitura¹¹⁸.

Na região de estudo, existem atualmente 5 Estações de tratamento de Efluentes e Esgotos (as ETEs de Araruama, Arraial do Cabo, São Pedro da Aldeia, Iguaba Grande, e Cabo Frio), e todas despejam seus efluentes tratados na Lagoa de Araruama. Nas proximidades do local de estudo, a ETE Jardim Esperança, localizada ao norte, próxima do Canal de Itajuru (em Cabo Frio), é a única que despeja seus efluentes no Rio Una¹¹⁹.

Uma característica comum dessas ETEs reside no fato de a captação de esgotos ser fortemente influenciada pelas chuvas. Isso ocorre devido à ausência de rede coletora separativa, havendo uma única rede que coleta águas pluviais e esgotos ao mesmo tempo¹¹⁸.

Embora o índice pluviométrico da região ainda seja baixo, entre 1000 e 2000 mm (para o ano de 1999), conforme mostrado na figura 3¹²⁰ uma sequência de dias de chuvas, com grande volume hídrico, pode provocar extravasamento da capacidade de tratamento de algumas dessas ETEs e conseqüentemente o esgoto e água da chuva sejam despejados diretamente na Lagoa de Araruama.

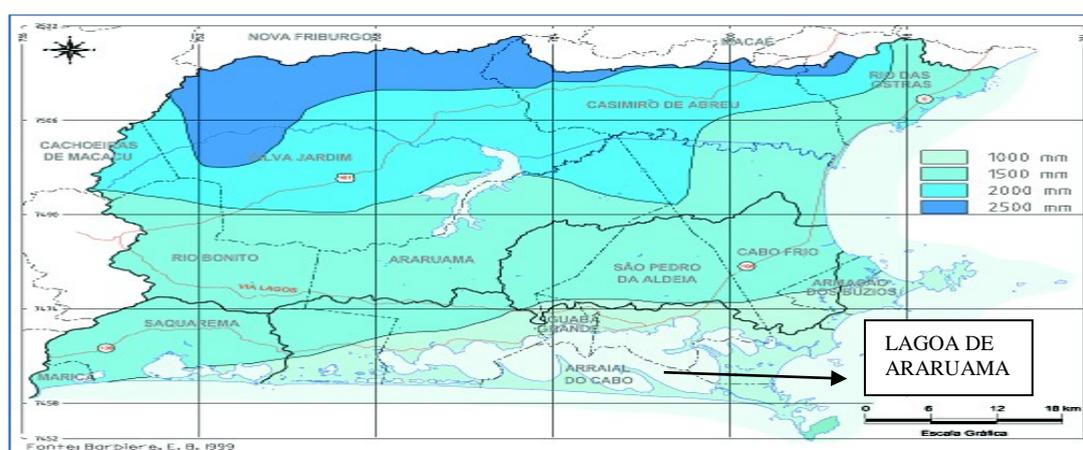


Figura 3: Mapa de distribuição de Chuvas¹²⁰.

A escolha desta região foi devida à suspeitas de alto grau de assoreamento e eutrofização da lagoa de Araruama e do Canal de Itajuru (principal conexão da Lagoa com o oceano Atlântico), lenta taxa de renovação das águas da lagoa, o forte caráter sazonal no tamanho da população, com a presença de Estações de Tratamento de Esgotos e Efluentes ineficientes ou com capacidades insuficientes para atendê-la, e também ao histórico de Reclamação da qualidade das águas e de saneamento nessa região^{118, 121}.

Há ainda relatos de pescadores da região de redução de peixes na Lagoa, gerando menor coleta de pescado, o que caracterizaria um possível cenário de impacto social sobre esses trabalhadores, e que poderia estar relacionada ao aporte de efluentes, tratados ou não, contendo estrogênios e outros interferentes endócrinos estrogênicos.

4.5 – Regime Amostral, locais e procedimento de coleta das amostras ambientais

Foram tomadas amostras dos 5 afluentes da Lagoa de Araruama a partir do início da manhã, em 2 meses distintos (novembro e dezembro de 2012), constituindo 2 campanhas.

A amostragem do mês de novembro foi realizada nos dias 05 e 09, alguns dias após um feriado que ocorreu próximo a um fim de semana, ao qual se supõe que tenha havido um relativo aumento populacional na região, sobrecarregando o sistema de esgoto.

Já a amostragem de dezembro aconteceu nos dias 10 e 14, distante de feriados, tentando caracterizar um cenário com o tamanho normal da população da região. Em cada uma das campanhas, os dados meteorológicos da região do dia da coleta e dos 7 dias anteriores foram pesquisados através dos dados da Estação Meteorológica automática de Arraial do Cabo, a única existente na região de estudo¹²²

Amostras foram recolhidas no rio Regamé (que recebe efluente tratado das ETE Araruama), na confluência entre o rio Regamé e lagoa de Araruama, em córrego que recebe o efluente da ETE Arraial do Cabo, na saída da tubulação da ETE de Cabo Frio, e em córrego que recebe o efluente da ETE de São Pedro da Aldeia. Todos esses pontos desembocam na Lagoa de Araruama. Na figura 4 são mostrados os pontos de coleta e as ETEs da região.

A Latitude e longitude de cada um dos pontos de coleta foram:

- a) Ponto A: Confluência entre rio regamé e lagoa de Araruama: Latitude 22°53'15.65"S e Longitude 42°22'16.92"O
- b) Ponto B: Ponte sobre o córrego adjacente a ETE de São Pedro da Aldeia: Latitude 22°49'38.76"S e Longitude 42°07'21.70"O
- c) Ponto C: Ponte sobre o rio regamé: Latitude 22°53'15.65"S e Longitude 42°22'16.92"O Latitude 22° 52'.59.45"S e longitude 42°22'08.89"O
- d) Ponto D: Saída da tubulação da ETE de Cabo Frio (exatamente em frente a esta ETE): Latitude 22°53'06.55"S e Longitude 42°03'14.10"O
- e) Ponto E: Estuário de córrego que recebe o efluente da ETE de Arraial do Cabo: Latitude 22°56'14.03"S e Longitude 42°04'47.04"O



Figura 4: Localização aproximada das Estações de tratamento de Efluentes que circundam a lagoa de Araruama e dos pontos de coleta utilizados. **Legenda:** Quadrados na cor laranja = ETEs da região. Triângulo verde = ponto de coleta C. Triângulo Vermelho = ponto de coleta A. Triângulo azul claro = ponto de coleta B. Triângulo branco = ponto de coleta D. Triângulo amarelo = ponto de coleta E. Fonte: adaptado de Google Earth (acesso em 09 de abril de 2013).

A metodologia de coleta foi adaptada do livro *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*¹¹⁴. As amostras foram captadas dos pontos de coleta com ajuda de um balde de 20 litros limpo e seco, ao qual em sua haste estava presa uma corda. As amostras foram colocadas em recipientes de vidro borossilicato âmbar de 4 litros, protegidas da luz, armazenadas em recipientes de isopor com gelo sintético, conforme mostra a figura 5.



Figura 5 – Coleta de amostra no ponto A.

A ficha de coleta conteve a identificação da amostra (com código), a identificação do ponto onde foi feita a amostragem e a data/hora da coleta.

No mesmo dia da coleta, as amostras foram transportadas refrigeradas para o laboratório, sendo filtradas e submetidas a extração em fase sólida dentro de um período de 48 horas desde o momento da coleta. Os cartuchos de extração em fase sólida usados são guardados dentro de congelador para posterior eluição.

4.6 – Análises realizadas em campo

O oxigênio dissolvido (OD), a condutividade, pH, os sólidos totais dissolvidos (STD), a salinidade e a temperatura foram mensurados em campo, no local da coleta, com auxílio da sonda multiparâmetros Hanna Modelo HI 98290-01, calibrada previamente em laboratório no dia anterior às análises

Esta sonda possui um cabo de longo comprimento, que foi mergulhado lentamente na água e deixada em cada ponto de coleta por cerca de 3 minutos para que se estabilizasse e fossem realizadas as mensurações.

4.7 – Análises de Demanda Química de oxigênio (DQO), Nitrogênio e Fósforo Totais.

As determinações desses 3 parâmetros foram feitas em triplicata de cada ponto de coleta das amostras e foram executadas no departamento de Saneamento e Saúde Ambiental da Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz (DSSA-ENSP-FIOCRUZ).

4.7.1 – Análises de Nitrogênio total

As determinações de Nitrogênio Total seguiram a metodologia de digestão do persulfato, descritos no kit do método 10071 para determinação de nitrogênio total fornecido pelo fabricante Hach¹²³. As etapas envolvem:

- 1) Transferência de 2 ml de cada amostra ou de água deionizada (controle negativo) para um tubo ao qual continha reagente persulfato
- 2) Homogeneização do tubo, deixando-a em tubo digestor a 105°C por 30 minutos
- 3) Após resfriamento dos tubos foi promovida a adição dos reagentes A e B fornecidos pelo kit.
- 4) Após o tempo de reação, foi promovida a transferência de 2 ml da solução obtida na etapa 3) para um tubo contendo o reagente C.
- 5) Há aparecimento de cor no tubo, ao qual foi lida diretamente no espectrofotômetro da marca HACH, modelo DR2500.

4.7.2 - Análises de Fósforo total

As determinações de fósforo Total seguiram a metodologia do ácido hidrolisável, descritos no kit do método 8190 fornecido pelo fabricante Hach¹²⁴. As etapas envolvem:

- 1) Transferência de 5 ml de cada amostra para um tubo com solução ácida
- 2) Adição de persulfato de potássio, e em seguida a mistura foi homogeneizada e deixada em bloco digestor a 150°C por 30 minutos.
- 3) Após resfriamento dos tubos, foi adicionado 2 mL de hidróxido de sódio 1,54 N com intuito de neutralização de pH.
- 4) Foi promovida a homogeneização dos tubos, sendo colocados no espectrofotômetro DR 2500 (HACH), previamente ajustado para o respectivo método para zerar a absorbância.

- 5) Foi adicionado o reagente de identificação de fósforo no tubo e, decorridos 2 minutos, foi lida diretamente a concentração de fósforo total no espectrofotômetro HACH, modelo DR2500.

4.7.3 – Análises de Demanda química de oxigênio (DQO)

As análises de Demanda Química de Oxigênio foram realizadas em concordância com o descrito no livro Standard Methods of the Examination of Water and Wasterwater¹¹⁴. As etapas incluem:

- 1) Preparação de um solução de 0,8500 g biftalato de potássio (previamente seco a $120 \pm 1^\circ\text{C}$ por 2 horas), dissolvida em água destilada em balão volumétrico de 1000 ml, gerando uma solução que apresenta DQO de 1000 mg.L^{-1} .
- 2) Preparação da solução catalítica, sendo adicionado 20,24 g de sulfato de prata em 2000 mL de ácido sulfúrico concentrado, ao qual foi promovida uma dissolução por 2 dias.
- 3) Elaboração da solução digestora, ao qual foi dissolvido 10,216 g de dicromato de potássio, previamente seco, em 500 mL de água destilada. Foi adicionado lentamente a esta solução 167 mL de ácido sulfúrico concentrado. Depois de uma completa dissolução, foi acrescentado 33,3g de sulfato de mercúrio e avolumado para 1,0 L com água destilada.
- 4) Construção de uma curva de calibração para DQO com diferentes volumes de solução padrão (50, 40, 30, 25, 20, 10 e 5,0 mL), sendo transferidas para balão volumétrico de 50 ml e avolumados com água destilada.
- 5) Retiradas de alíquotas de 2 ml das soluções obtidas na etapa anterior, sendo transferidas para tubos de DQO
- 6) Foi promovida a adição de 1,2 ml da solução digestora e 2,8 mL da solução catalítica.
- 7) Os tubos foram deixados em bloco digestor à 140°C e, após um período de digestão de 2 horas, as suas respectivas absorbâncias no comprimento de onda de 600 nm foram lidas em Espectrofotômetro HACH modelo DR2500.

- 8) Pelos valores da absorvância mensurados e da concentração de cada padrão, foi elaborada uma Curva de Calibração, com uma equação de reta que permite o cálculo de DQO das amostras reais.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Metodologia Cromatográfica para 17- α etinilestradiol, estrona e 17- β estradiol

Primeiramente, serão detalhados os resultados dos testes de otimização do método. Em seguida, serão explicitados os dados de validação.

5.1.1 – Otimização do método

5.1.1.1 – Estudo das condições da reação de derivatização dos estrogênios

Primeiramente, foram testadas as condições da reação de derivatização, sendo estudadas a temperatura (60 ou 70°C) e o uso ou não de aquecimento em micro-ondas em amostras de padrão na concentração 1,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados obtidos estão inseridos no quadro 5.

Quadro 5 – Resultados do teste de otimização da reação de derivatização para as substâncias estrona, 17- β estradiol e 17- α etinilestradiol (na concentração 1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)

BETA ESTRADIOL				
Metodo em teste	média das áreas dos picos	desvpadrão	variância	CV%
A	2385987,25	107601,84	11578156858,25	4,51
B	2058150,25	154001,36	23716418734,92	7,48
C	2158150,25	131426,10	17272818734,92	6,09
D	1930650,25	154089,45	23743557068,25	7,98
ESTRONA				
Metodo em teste	média das áreas dos picos	desvpadrão	variância	CV%
A	1556049,75	62985,57	3967181669,58	4,05
B	1483802,25	98465,33	9695420434,92	6,64
C	1506302,25	65281,38	4261658768,25	4,33
D	1431302,25	112329,76	12617975434,92	7,85
ETINILESTRADIOL				
Metodo em teste	média das áreas dos picos	desvpadrão	variância	CV%
A	617182,75	26741,52	715108898,25	4,33
B	553013,75	24190,47	585178912,92	4,37
C	563013,75	24190,47	585178912,92	4,30
D	543013,75	24190,47	585178912,92	4,45

Pela visualização dos resultados obtidos, foi possível observar que o método A (derivatização a 60°C sem uso de micro-ondas) foi o melhor procedimento, obtendo melhores resultados, com maiores áreas dos picos das 3 substâncias e baixos coeficientes de variação, sendo o método de derivatização usado neste trabalho.

Foi observado ainda que, para uma mesma temperatura de derivatização, o uso de micro-ondas como etapa de pré-derivatização gerou piores resultados (métodos B e D), ao qual se suspeita que a potência aplicada (700W), usada durante o período de 1 minuto, pode ser muito agressiva e promover grande degradação dos estrogênios silanizados, resultando em menores áreas dos picos nos cromatogramas.

De certa forma, os resultados obtidos não corroboram os achados de estudo¹⁰⁹ que substituiu o aquecimento prolongado com temperatura controlada por uso de forno micro-ondas em elevada potência por curtos períodos de tempo.

5.1.1.2 – Estudo das condições de Extração em Fase Sólida.

Foram testados, em triplicata, os 3 protocolos de extração em fase sólida diferentes, com as amostras reais de afluente do ponto de coleta B fortificadas com a mistura de estrogênios na concentração 0,75 µg.mL⁻¹.

Os resultados desses procedimentos são mostrados no quadro 6 e os % de recuperação foram calculados com auxílio da equação da reta obtida na curva de calibração realizada na matriz (item 5.4.2.2).

Quadro 6 - Resultados dos testes de otimização da extração em fase sólida para as substâncias estrona, 17-β estradiol e 17-α etinilestradiol (na concentração 0,75 µg.mL⁻¹)

BETA ESTRADIOL				
Metodo em teste	média das áreas dos picos	desvpadrão	variância	CV%
A	2385987,25	107601,84	11578156858,25	4,51
B	2058150,25	154001,36	23716418734,92	7,48
C	2158150,25	131426,10	17272818734,92	6,09
D	1930650,25	154089,45	23743557068,25	7,98
ESTRONA				
Metodo em teste	média das áreas dos picos	desvpadrão	variância	CV%
A	1556049,75	62985,57	3967181669,58	4,05
B	1483802,25	98465,33	9695420434,92	6,64
C	1506302,25	65281,38	4261658768,25	4,33
D	1431302,25	112329,76	12617975434,92	7,85
ETINILESTRADIOL				
Metodo em teste	média das áreas dos picos	desvpadrão	variância	CV%
A	617182,75	26741,52	715108898,25	4,33
B	553013,75	24190,47	585178912,92	4,37
C	563013,75	24190,47	585178912,92	4,30
D	543013,75	24190,47	585178912,92	4,45

O segundo procedimento (B) foi o escolhido neste trabalho pois apresentou, em geral, o maior percentual de recuperação para os 3 estrogênios, com aceitáveis valores de coeficiente de variação, abaixo de 10%. Foi interessante observar que, para o 17-α etinilestradiol, o % de recuperação do procedimento B foi levemente superior ao do

procedimento A (validado pela USEPA para determinação desse analito em ELISA monoclonal).

Os resultados demonstram que a utilização de um sistema de eluição composto por 2 substâncias (hexano e acetona, na proporção 1:1) foi mais eficiente que o uso apenas da acetona como eluente (procedimento C). Esses resultados corroboram os encontrados no estudo¹⁰⁷ que propôs este método B, ao qual os resultados de % de recuperação obtidos com acetona como único eluente também foram inferiores aos obtidos com o sistema de eluição acetona:hexano 1:1.

Uma explicação possível para este fato reside no uso de 2 eluentes com características de polaridade distintas (sendo o hexano um solvente apolar e a acetona com características de alta polaridade), conseguindo eluir de forma mais eficiente os estrogênios estudados, que apesar de serem substâncias apolares, apresentam grupamentos polares em suas estruturas, conforme mostra a figura 1 (item 2.3.1).

5.1.2 – Validação da Metodologia

5.1.2.1 – Seletividade e efeito de matriz

Foram elaboradas 2 curvas de calibração, uma feita com a diluição da mistura dos padrões de estrona, 17- β estradiol e 17- α etinilestradiol nas concentrações de 0,15, 0,25, 0,50, 0,75 e 1,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ em solventes acetona/hexano 1:1, e outra curva, com as mesmas concentrações dos padrões, na matriz (afluente do ponto de coleta B).

O quadro 7 e a figura 6, mostram que as retas quase se sobrepõem, o que demonstra que os efeitos de matriz são praticamente inexistentes.

Além da sobreposição das curvas, analisando um cromatograma típico de análise dos padrões na matriz (figura 7) foi possível visualizar uma boa separação e resolução dos picos, mostrando que o método foi seletivo para análises desses estrogênios. Os tempos de retenção obtidos foram 16,43, 16,78 e 17,64 minutos para estrona, 17- β estradiol e 17- α etinilestradiol dissubstituído, respectivamente,

Quadro 7 – Valores usados na elaboração de curva de calibração na matriz de efluente e em solvente.

ESTRONA				
concentração ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)	média das áreas dos picos (matriz)	Desvio Padrão (matriz)	média das áreas dos picos (solvente)	Desvio Padrão (solvente)
0,5	580262,43	38297,32	632486,0471	30359,33
0,75	933183,86	66256,05	998506,7271	54917,87
1	1519184,86	97227,83	1610335,949	83737,47
0,15	301234,86	15664,21	322321,2971	14504,46
0,25	372295,71	29039,07	387187,5429	22456,88
BETA ESTRADIOL				
concentração ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)	média das áreas dos picos (matriz)	Desvio Padrão (matriz)	média das áreas dos picos (solvente)	Desvio Padrão (solvente)
0,5	810487	53492,142	875325,96	45516,95
0,75	1367087,571	84759,4294	1490125,452	71526,02
1	2254269,429	135256,1657	2389525,595	129034,38
0,15	266025,2857	15429,46657	284647,0557	13947,71
0,25	451879,4286	27112,76572	469954,6057	25847,50
ETINILESTRADIOL				
concentração ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)	média das áreas dos picos (matriz)	Desvio Padrão (matriz)	média das áreas dos picos (solvente)	Desvio Padrão (solvente)
0,5	219350,86	14477,15676	239092,4374	11476,44
0,75	368732,71	24705,09157	394543,9997	19332,66
1	584724,71	35083,4826	619808,1926	32230,03
0,15	76901,86	4921,71904	83054,0088	3903,54
0,25	131249,57	7612,47506	139124,5442	6817,10

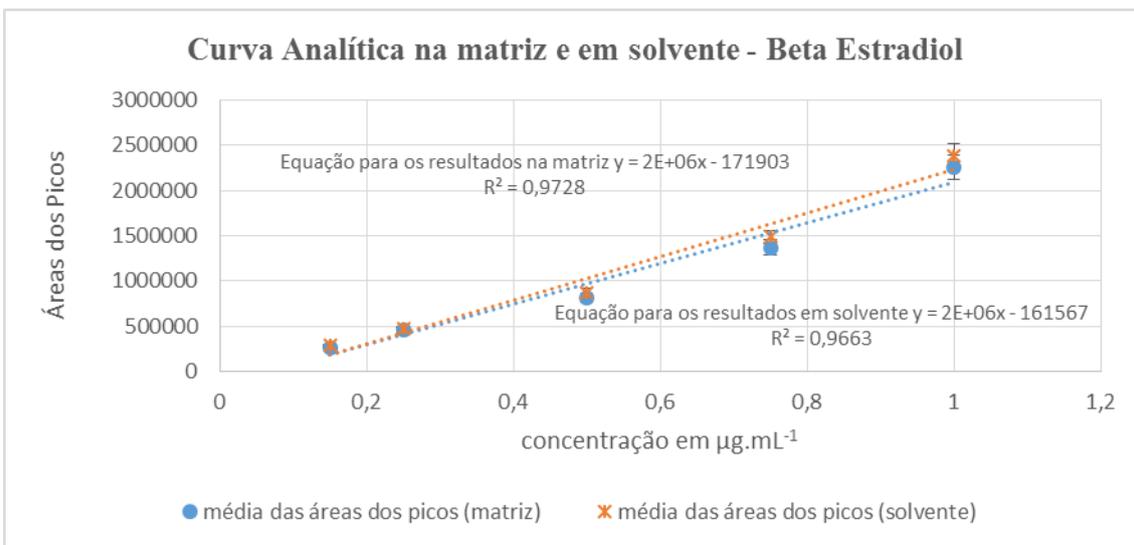


Figura 6 (a)

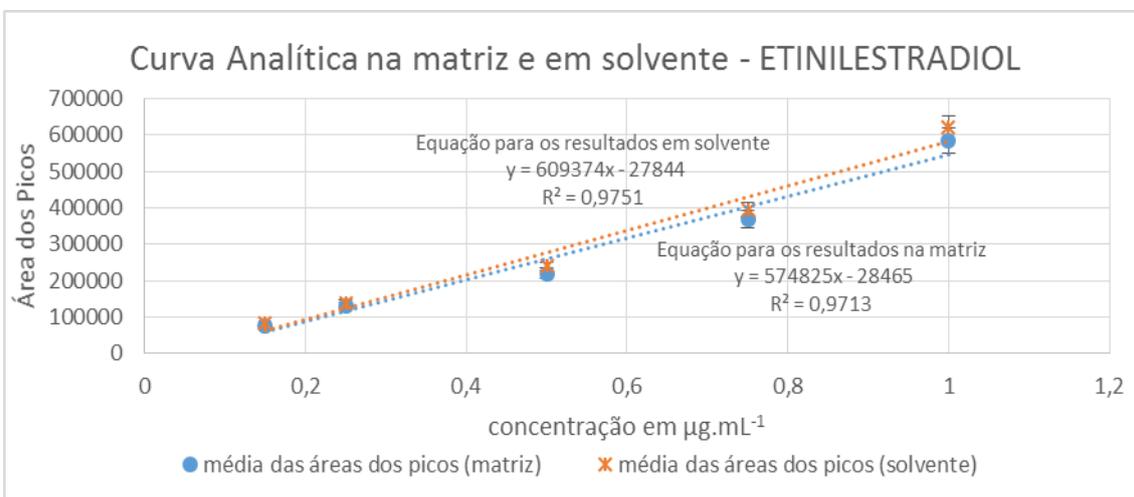


Figura 6 (b)

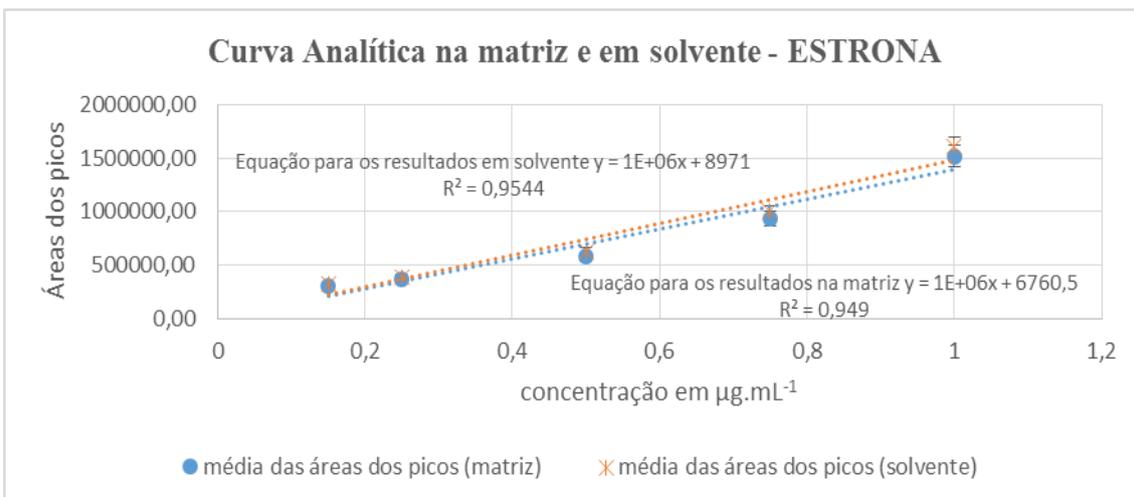


Figura 6 (c)

Figura 6 - Curva de calibração na matriz de efluente e em solvente para 17-β estradiol (a), 17-α etinilestradiol (b) e estrona (c).

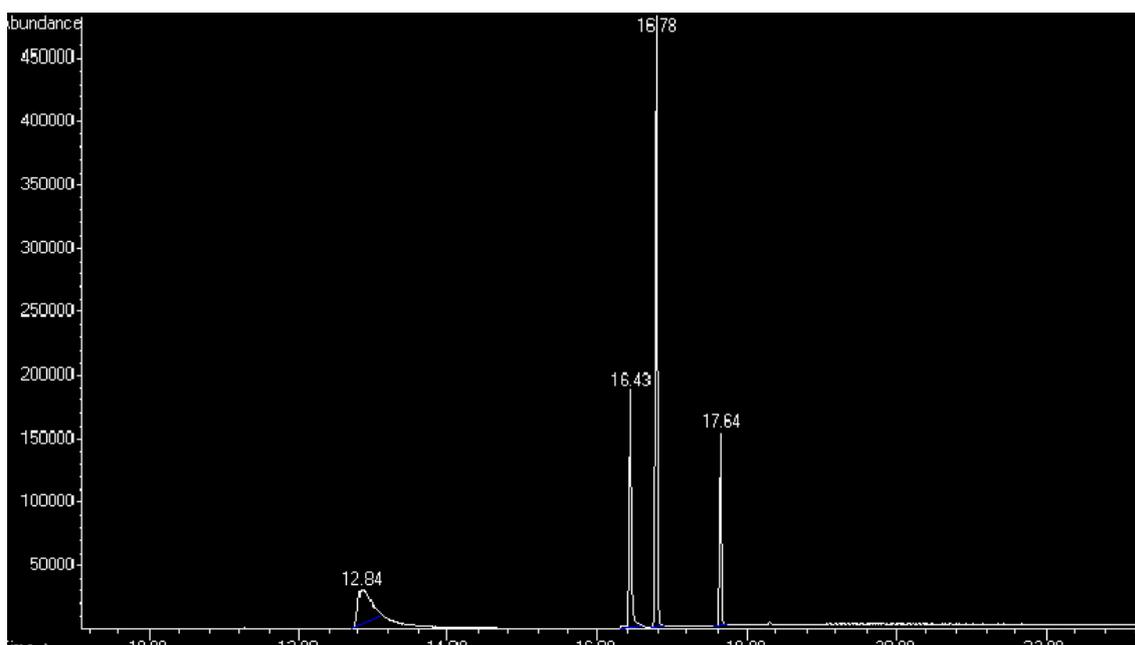


Figura 7 – Cromatograma de determinação dos estrogênios estrona (16,43 minutos), 17- β estradiol (16,78 minutos) e 17- α etinilestradiol dissustituído (17,64 minutos) na concentração 1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em matriz de afluente.

5.1.2.2 – Linearidade e faixa de trabalho

A curva de calibração foi obtida a partir do método de adição padrão, fortificando a matriz de afluente com as concentrações da faixa de trabalho (0,15 a 1,00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Para descobrir valores aberrantes (outliers) obtidos na curva, foi realizado o teste de Grubbs, conforme descrito no ítem 2.6.1.2, usando-se G_{tabelado} para $n=4$ e $\alpha=0,05$.

Analisando os resultados, expostos no quadro 8 (Análise de valores aberrantes da curva analítica através do teste de Grubbs), os valores de G_{superior} e G_{inferior} obtidos foram menores que G_{tabelado} , indicando que não ocorreu nenhum valor aberrante nos resultados da curva analítica.

Quadro 8 – Análise de valores aberrantes da curva analítica através do teste de Grubbs

17- β ESTRADIOL						
concentração $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	média	desvio	CV(%)	G_{sup}	G_{inf}	Conclusão
0,5	842801,00	23700,3	2,812	1,237	1,046	<1,4812
0,75	1354558,8	26232,2	1,937	1,235	1,143	<1,4812
1	2310987,3	16091,6	0,696	1,324	0,890	<1,4812
0,15	268779,8	3934,2	1,464	1,450	0,831	<1,4812

Continuação Quadro 8						
17-β ESTRADIOL						
concentração µg.ml ⁻¹	média	desvio	CV(%)	Gsup	Ginf	Conclusão
0,25	468321,8	7567,0	1,616	0,981	1,382	<1,4812
17-A ETINILESTRADIOL						
0,5	225248,0	4144,6	1,840	1,302	0,956	<1,4812
0,75	386649,3	13073,9	3,381	0,972	1,005	<1,4812
1	609682,8	8889,5	1,458	1,055	1,346	<1,4812
0,15	80016,8	891,5	1,114	1,041	1,350	<1,4812
0,25	134755,5	4303,4	3,193	1,199	1,245	<1,4812
ESTRONA						
0,5	570886,0	24667,0	4,321	1,054	1,311	<1,4812
0,75	915023,3	22173,0	2,423	0,929	1,055	<1,4812
1	1506302,3	65281,4	4,334	1,087	1,003	<1,4812
0,15	308391,5	35422,4	11,486	1,148	1,045	<1,4812
0,25	375869,0	30207,9	8,037	0,840	1,215	<1,4812

Também foi realizado o teste de Levene, ao qual foi analisada a homogeneidade da variância dos resíduos. Os resultados estão explicitados na tabela 6, e foi possível notar que os resultados para os 3 estrogênios apresentaram homocedasticidade, com os valores de p obtidos maiores que 0,05 (0,318, 0,179 e 0,406 para 17-β estradiol, 17-α etinilestradiol e estrona, respectivamente).

Tabela 6 – Resultados do Teste de Levene para avaliação de Homocedasticidade.

Homogeneidade da Variância dos Resíduos (Teste de Levene)

Beta Estradiol	
Indicador	Resultado
Variância Combinada	2,04E+10
t _L calculado	-1,03E+00
t _{tabelado} (α = 0,05)	2,10E+00
p	3,18E-01
Etinilestradiol	
Variância Combinada	1,88E+09
t _L calculado	-1,40E+00

Continuação Tabela 6

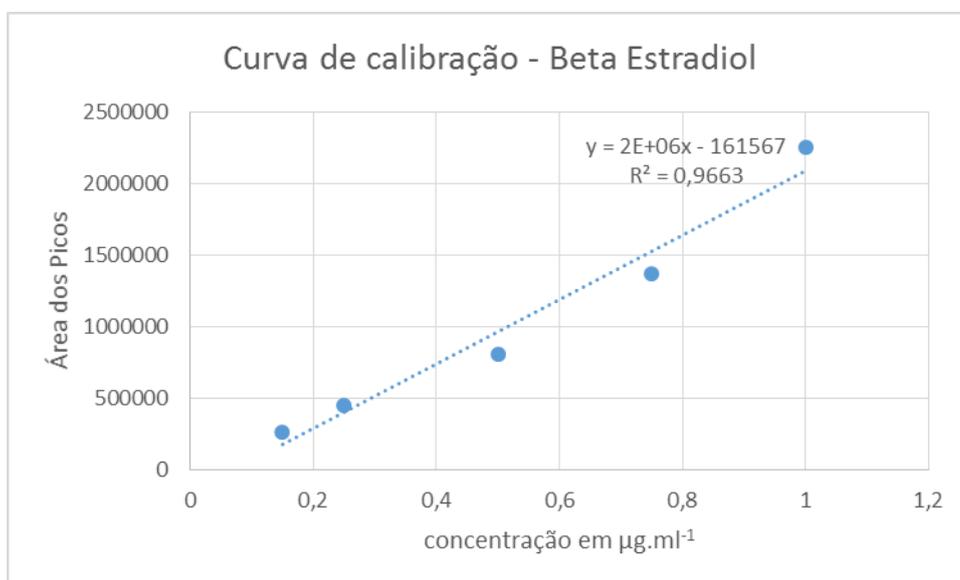
Etinilestradiol	
t _{tabelado} (a = 0,05)	2,10E+00
p	1,79E-01
Variância Combinada	1,88E+09
Estrona	
Indicador	Resultado
Variância Combinada	1,44E+10
t _L calculado	-8,50E-01
t _{tabelado} (a = 0,05)	2,10E+00
p	4,06E-01

Então, mediante a aprovação dos testes estatísticos supracitados, foi elaborada a curva de calibração na matriz, nas concentrações de 0,15, 0,25, 0,50, 0,75 e 1,00 µg.ml⁻¹, gerando os dados do quadro 9 e a figura 8.

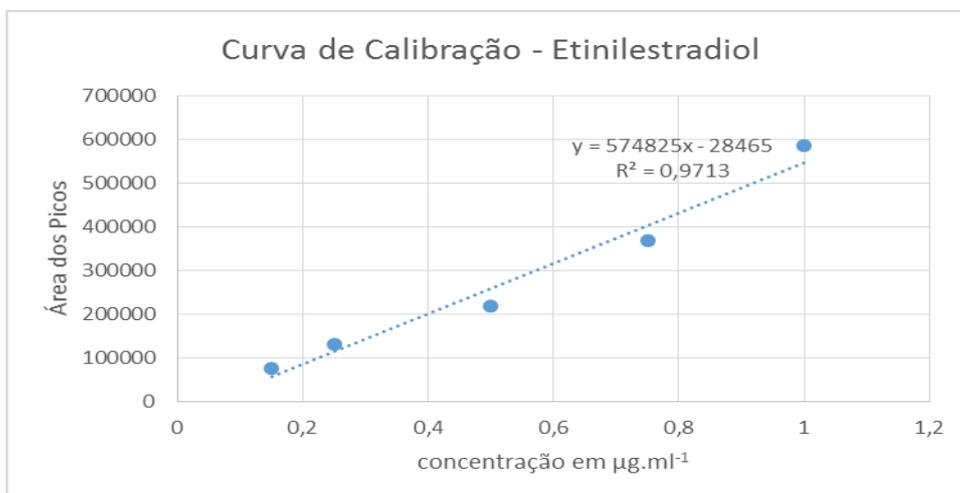
Quadro 9 – Dados para a elaboração da curva de calibração na matriz.

17-B ESTRADIOL				
concentração (µg.ml⁻¹)	média das áreas	Desvio Padrão	Variância	CV%
0,5	810487	52062,30	2710482922,33	6,42
0,75	1367087,571	72532,61	5260978898,95	5,31
1	2254269,429	71657,33	5134772781,95	3,18
0,15	266025,2857	20812,71	433168765,24	7,82
0,25	451879,4286	22127,68	489634060,95	4,90
17-A ETINILESTRADIOL				
concentração (µg.ml⁻¹)	média das áreas (matriz)	Desvio Padrão	Variância	CV%
0,5	219350,86	18423,35	339419753,14	8,40
0,75	368732,71	25015,04	625752070,90	6,78
1	584724,71	32148,07	1033498489,24	5,50
0,15	76901,86	6326,68	40026846,48	8,23
0,25	131249,57	5414,35	29315228,62	4,13

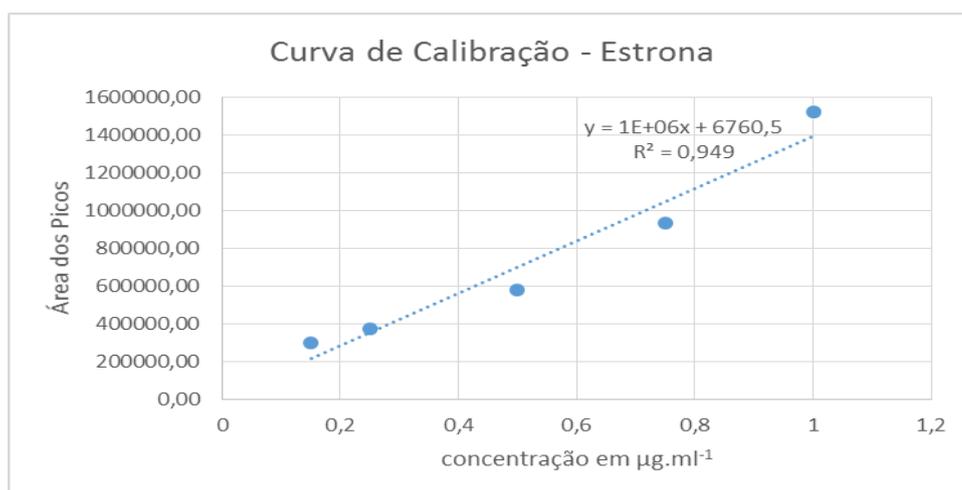
Continuação Quadro 9				
ESTRONA				
concentração ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	média das áreas (matriz)	Desvio Padrão	Variância	CV%
0,5	580262,43	26915,69	724454606,62	4,64
0,75	933183,86	53398,86	2851438232,14	5,72
1	1519184,86	50815,23	2582188072,14	3,34
0,15	301234,86	28463,99	810198833,14	9,45
0,25	372295,71	27289,70	744727546,24	7,33



8(a)



8(b)



8(c)

Figura 8 – Curvas de calibração na matriz de afluyente obtidas para 17-β estradiol (7a), 17-α etinilestradiol (7b) e estrona (7c).

Foi possível notar que as equações das retas obtidas apresentaram coeficiente de determinação e de correlação altos (acima de 0,94), indicando uma forte correlação positiva entre as variáveis e permitindo que esta curva seja utilizada para quantificação.

5.1.2.3 – Limite de Detecção e de Quantificação

O limite de detecção do método foi calculado a partir da equação 4 (disposta no item 2.6.1.4), com o desvio padrão das áreas dos picos obtidas na concentração da mistura dos 3 estrogênios a 0,15 µg.ml⁻¹, em 7 replicatas. O resultado gerado foi então lançado na equação obtida na curva de calibração, encontrando-se, ao final, a concentração do LD do método.

Foi calculado ainda o LD do método para as amostras reais, tendo em vista que se aplicou um fator de concentração de 10000 vezes, partindo de um volume de amostra ambiental de 500 ml para, ao final da análise, obter 50 µL em BSTFA/piridina.

Os resultados de LD estão explicitados na tabela 7 (Cálculo do Limite de Detecção do Método para os estrogênios) e mostram concentrações que vão de 18 a 23 ng.l⁻¹ para os estrogênios.

Tabela 7 - Cálculo do Limite de Detecção do Método para os estrogênios

BETA ESTRADIOL

Média das áreas	Desvio Padrão	LD (Área)	LD (µg.ml ⁻¹)	LD amostra (ng.l ⁻¹)
266025,2857	20812,7100	65414,3475	0,1809	18,0900

Continuação Tabela 7

ETINILESTRADIOL				
Média das áreas	Desvio Padrão	LD (Área)	LD ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	LD amostra (ng.l^{-1})
76901,8600	6326,6800	19884,7552	0,2388	23,8754
ESTRONA				
Média das áreas	Desvio Padrão	LD (Área)	LD ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	LD amostra (ng.l^{-1})
301234,8571	28463,9900	89462,3206	0,1889	18,8879

Já no cálculo do limite de quantificação, foi multiplicada a média dos valores das áreas dos picos mensurados das 7 replicatas na concentração por 5 vezes o desvio padrão amostral das mesmas. O resultado gerado foi então lançado na equação obtida na curva de calibração, encontrando, ao final, a concentração do LQ do método.

Foi calculado ainda o LQ para as amostras reais, tendo em vista que se aplicou um fator de concentração de 10000 vezes, partindo de um volume de amostra ambiental de 500 ml para, ao final da análise, obter 50 μL .

Os resultados de LQ estão explicitados no quadro 10 (Cálculo do Limite de Quantificação do Método para os estrogênios) e mostram concentrações de 28 a 36 ng.l^{-1} para os estrogênios.

O LQ obtido para 17- α etinilestradiol pelo método cromatográfico validado neste estudo (33.0018 ng.l^{-1}) foi mais baixo que o estabelecido pela metodologia ELISA monoclonal (50 ng.l^{-1}), demonstrando que a metodologia por GC-MS usada foi capaz de quantificar concentrações mais baixas deste analito.

Os resultados de LD e LQ obtidos foram compatíveis com os relatados na literatura científica, estando na mesma ordem de grandeza e com concentrações próximas aos obtidos por outros estudos relatados na literatura^{23, 58, 107}

Quadro 10 - Cálculo do Limite de Quantificação do Método para os estrogênios

BETA ESTRADIOL				
Média	Desvio Padrão	LQ (Área)	LQ ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	LQ amostra (ng.l^{-1})
266025,2857	20812,7100	370088,82	0,286493427	28,6493
ETINILESTRADIOL				
Média	Desvio Padrão	LQ (Área)	LQ ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	LQ amostra (ng.l^{-1})
76901,8600	6326,6800	108535,24	0,330018298	33,0018

Continuação Quadro 10				
ESTRONA				
Média	Desvio Padrão	LQ (Área)	LQ ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	LQ amostra (ng.l^{-1})
301234,8571	28463,9900	443554,82	0,362527001	36,2527

5.1.2.4 – Precisão

A precisão do método pode ser expressa pelos valores de desvio padrão e desvio padrão relativo (cv%) e também pelo cálculo do limite de repetitividade r .

O limite de repetitividade foi calculado utilizando a equação 6, conforme descrito no item 2.6.1.6. Foi usada a concentração $0,15 \mu\text{g.ml}^{-1}$, sendo analisada em 7 replicatas. Os resultados estão expressos na tabela 8, com o cálculo de limite de repetitividade no intervalo de confiança de 95%, e mostram que o método apresentou boa precisão, pois a diferença entre os valores de área obtidos pelas replicatas, para as 3 substâncias, é inferior ao r calculado.

Tabela 8 - cálculo de limite de repetitividade no intervalo de confiança de 95%

Substância	Valores de r , feito a partir da concentração $0,15 \mu\text{g.ml}^{-1}$
17- β estradiol	58273,6
17- α etinilestradiol	17714,704
estrona	79699,172

A precisão intermediária, avaliando a diferença de resultados pela variação de analistas, também foi estudada. Utilizou-se as equações (7) e (8)

Os resultados, englobados na tabela 9, mostram que, para todas as 3 substâncias, o t calculado foi inferior ao t tabelado. Então, com intervalo de confiança de 95%, foi possível concluir que não houve mudança significativa nos resultados ao variar os operadores na análise das amostras pelo método.

Tabela 9 – Resultados da Precisão intermediária através do teste t de Student.

17-B ESTRADIOL		
$t_{\text{calculado}}$	t_{tabelado}	Conclusão
0,011	2,306	$t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$
17- α ETINILESTRADIOL		
$t_{\text{calculado}}$	t_{tabelado}	Conclusão
0,619	2,306	$t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$

Continuação Tabela 9

ESTRONA		
<i>t</i> _{calculado}	<i>t</i> _{tabelado}	Conclusão
1,166	2,306	<i>t</i> _{calculado} < <i>t</i> _{tabelado}

5.1.2.5 – Robustez

O parâmetro robustez foi avaliado com auxílio do teste de Youden, aplicado a 3 fatores (temperatura de derivatização, condição de secagem das amostras e temperatura do injetor) que se suspeitavam que pudessem interferir no método.

Foram calculados os efeitos de cada um dos fatores e o desvio padrão das 8 replicatas de cada fator. Os resultados obtidos, expostos no quadro 11, mostram que a modificação das condições dos 3 fatores de estudo não produziu variação significativa dos resultados analíticos.

Isto ocorreu pois não foram obtidos valores de efeito superior ao desvio padrão multiplicado pela raiz quadrada de dois ($s\sqrt{2}$), condição necessária para que seja julgado como significante.

Logo, a metodologia utilizada foi robusta frente a esses 3 fatores de modificação do método.

Quadro 11 – Resultados resumidos de avaliação da robustez do método.

17-B ESTRADIOL				
Efeito da temperatura do injetor	Efeito da temperatura de derivatização	Efeito da condição de secagem	$s\sqrt{2}$	Conclusão
19873,75	31823,50	29714	33517,28	Efeito de cada um dos fatores < $s\sqrt{2}$
17-α ETINILESTRADIOL				
Efeito da temperatura do injetor	Efeito da temperatura de derivatização	Efeito da condição de secagem	$s\sqrt{2}$	Conclusão
2998,00	4681,75	5146,25	5861,36	Efeito de cada um dos fatores < $s\sqrt{2}$

Continuação Quadro 11				
ESTRONA				
Efeito da temperatura do injetor	Efeito da temperatura de derivatização	Efeito da condição de secagem	$s\sqrt{2}$	Conclusão
19823,25	26581	28310,25	34884,41	Efeito de cada um dos fatores $< s\sqrt{2}$

5.1.2.6 – Tendência/Recuperação

Os testes de recuperação foram realizados em matriz fortificada em 3 concentrações diferentes da faixa de trabalho (0.25, 0.75 e 1.00 $\mu\text{g.l}^{-1}$). A tabela 10 mostra que os resultados obtidos foram aceitáveis (superiores a 50% de recuperação, conforme estabelecido pelo guia do INMETRO para Validação de Métodos de Ensaio Químicos¹¹¹) sendo sempre acima de 66%, para os 3 estrogênios, nas concentrações analisadas.

No entanto, em decorrência das peculiaridades da constituição das amostras e de seus possíveis interferentes, assim como pela diferença de materiais utilizados (sobretudo os cartuchos de extração), os resultados de % de recuperação gerados estão um pouco abaixo dos obtidos por outros estudos que embasaram o desenvolvimento da metodologia deste trabalho, que obtiveram recuperação em torno de 90% para 17- β estradiol²³ e 68 %, 120% e 90% para 17- β estradiol, estrona e 17- α etinilestradiol, respectivamente¹⁰⁷.

Como a média de recuperação das 3 concentrações obtidas foi de 72,95% 68,28% 67,18% para 17- β estradiol, 17- α etinilestradiol e estrona (respectivamente), foi usado, no cálculo das concentrações das amostras reais, os valores de 0,7295, 0,6828 e 0,6718 como fatores de correção de recuperação para os supracitados estrogênios, respectivamente.

Tabela 10 – Resultados dos testes de recuperação dos estrogênios em 3 concentrações diferentes (em $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

17-B ESTRADIOL		
Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% Recuperação	CV %
0,25	69,71	7,12
0,75	72,93	6,55
1,00	76,22	5,98
17-α ETINILESTRADIOL		
Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% Recuperação	CV %
0,25	71,47	4,91
0,75	68,99	6,84
1,00	64,37	8,31
ESTRONA		
Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% Recuperação	CV %
0,25	63,81	5,26
0,75	66,11	4,07
1,00	71,62	7,48

5.2 – Metodologia ELISA monoclonal para 17- α etinilestradiol

5.2.1 – Elaboração da curva de calibração e testes de recuperação

Foi elaborada uma curva de calibração com as concentrações 0,00, 0,05, 0,15, 0,50, 1,50 e 3,00 $\mu\text{g.l}^{-1}$ com auxílio dos padrões de 17- α etinilestradiol, mostrado no quadro 12.

Quadro 12 – Resultados obtidos dos padrões em concentrações conhecidas de 17- α etinilestradiol para teste ELISA monoclonal

Concentração estimada ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	Média das absorbâncias	Desvio padrão	Variância	Coefficiente de variação
0,00	1,40167	0,02635	0,00069	1,87992
0,05	1,06433	0,03763	0,00142	3,53594
0,15	0,66433	0,04537	0,00206	6,82923
0,50	0,31867	0,00737	0,00005	2,31311
1,50	0,17100	0,00781	0,00006	4,56740
3,00	0,13533	0,01210	0,00015	8,93855

Continuação Quadro 12				
Concentração estimada ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	Média das absorvâncias	Desvio padrão	Variância	Coefficiente de variação
Amostra real fortificada à 0,50	0,38510	0,02333	0,00054	7,32638
Amostra de Branco da matriz	1,35393	0,03040	0,00092	10,18613

Normalmente, as curvas de calibração obtidas em metodologia ELISA geram um formato sigmoidal, dificultando o estabelecimento de uma relação linear entre as concentrações dos padrões usadas e as absorvâncias lidas.

Com intuito de se obter uma reta e uma equação da mesma, foi aplicado o log da concentração e o log das absorvâncias obtidas. O gráfico gerado é mostrado na figura 9.

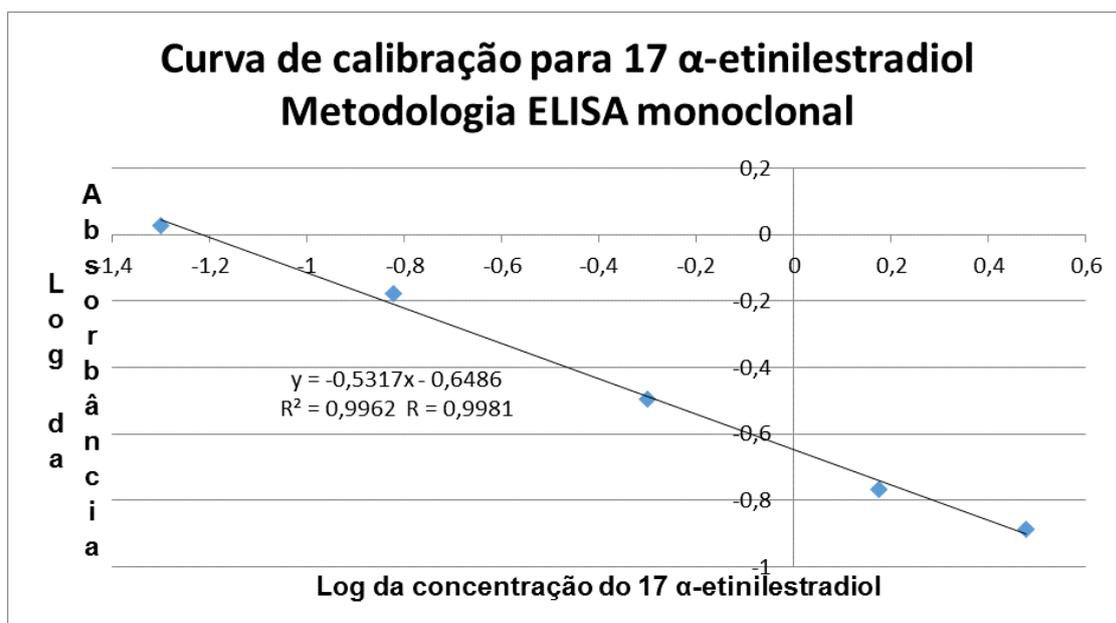


Figura 9 - Curva de Calibração de 17- α etinilestradiol para teste ELISA monoclonal

A reta gerada obteve altos coeficientes de correlação e de determinação (ambos acima de 0,99), indicando que a curva analítica pode ser utilizada na quantificação de amostras.

Foi promovido ainda um teste de recuperação com amostra da matriz colhida no ponto de coleta B analisada sem ser fortificada (ao qual foi considerada o branco da matriz) e fortificada com $0,50 \mu\text{g.l}^{-1}$, ambas submetida a extração em fase sólida conforme descrito no método.

Sendo utilizada a equação 7, descrita no ítem 2.6.1.8, a recuperação obtida dessa amostra fortificada foi de 65,72%, ao qual foi considerada satisfatória, uma vez que na descrição do método o % de recuperação esperado é de 62 a 120%, dependendo da natureza da amostra¹⁰³.

O cálculo final da concentração do analito na amostra real utilizou o valor do fator de correção da recuperação de 0,6572, que é obtido dividindo-se a % de recuperação por 100, e o fator de concentração de 1000 vezes (visto que partindo de 500 ml de amostra ambiental ao final se obtém 500 µl da amostra, obtida depois do processo de extração em fase sólida).

5.3 - Características meteorológicas dos dias das coletas e Análises de Campo

Ambas as campanhas ocorreram em dias secos, sem chuva, e os resultados dos dados meteorológicos são expressos na tabela 11.

Tabela 11: Dados da Estação Meteorológica automática de Arraial do Cabo¹²²

Data	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Vento (m/s)	Chuva (mm)
Média de 29/10/12 a 04/11/12 (7 dias prévios a primeira campanha)	24,5	72	7,7	0,1
Média de 05/11/12 a 09/11/2012 (semana em que ocorreu a primeira campanha)	24,1	68	7,1	0,0
Média de 03/12/12 a 09/12/12 (7 dias prévios a segunda campanha)	23,5	70	6,8	0,0
Média de 10 a 14/12/12 (semana em que ocorreu a segunda campanha)	23,9	69	7,0	0,0

Foi possível notar que os indicadores meteorológicos de ambas as campanhas e dos dias prévios são parecidos, com praticamente ausência de chuvas no período.

Já os dados das análises de campo, que fornecem características físico-químicas das amostras, estão expostos no quadro 13 e 14 (primeira e segunda campanha).

Quadro 13: Parâmetros físico-químicos da primeira campanha

Ponto de Coleta	Temperatura da Água (°C)	pH	OD (mg/l)	Salinidade	SDT (ppm)	Condutividade (µS/cm)
A	26,75	9,03	3,53	38,80	29120	58310
B	26,53	7,80	5,03	0,61	623	1238
C	27,10	8,03	5,75	0,78	684	1581
D	26,22	7,62	4,88	0,73	716	1747
E	25,93	8,12	5,04	0,59	592	1189

Quadro 14: Parâmetros físico-químicos da segunda campanha

Ponto de Coleta	Temperatura da Água (°C)	pH	OD (mg/l)	Salinidade	SDT (ppm)	Condutividade (µS/cm)
A	30,95	8,78	3,91	40,81	30580	61160
B	29,63	7,70	8,94	0,42	432	871
C	29,10	7,58	7,72	0,52	397	779
D	30,14	7,81	6,94	0,49	388	758
E	30,40	7,65	8,45	0,61	414	843

Ao se observar os resultados, primeiramente foi possível notar que o ponto A, o único que é localizado na lagoa de Araruama (na confluência das águas entre a lagoa e o rio Regamé) apresenta resultados distintos aos demais pontos, que são constituídos ou influenciados em sua composição, por efluentes tratados das estações de tratamento da região e que desembocam na Lagoa de Araruama.

O ponto A apresentou, nas 2 campanhas, valores de salinidade, teor de sólidos dissolvidos totais (SDT), condutividade e salinidade altos, característicos de água salina, com grande presença de íons dissolvidos, sobretudo cloreto (o qual foi deduzido pela alta salinidade, acima de 30‰ nas 2 campanhas).

Outra informação relevante diz respeito ao oxigênio dissolvido (OD), parâmetro importante relacionado a manutenção da vida de espécies aeróbias no ambiente aquático. Foram observados níveis de OD muito baixos (inferiores a 6 mg/l) em todos os pontos na primeira coleta e superiores a 6 mg/l na segunda coleta. Logo, é possível supor que há uma pior qualidade da água nos pontos de coleta analisados na primeira campanha, a partir deste importante indicador.

Valores baixos de OD indicam que a manutenção da vida de espécies aeróbias que vivem neste ambiente podem estar sob risco, visto que as espécies aquáticas necessitam de oxigênio dissolvido no ambiente aquático para manutenção de suas funções vitais, sobretudo os processos de respiração aeróbia.

Foi possível concluir também que o ponto A, na lagoa de Araruama, estaria em desacordo com a legislação vigente no país, expressa na seção XIII, artigo 18, da resolução CONAMA número 357, de 18/03/2005¹²⁵. Uma vez que a água é classificada como salina (com salinidade acima de 30%, segundo esta resolução), o pH máximo permitido é de 8,5 e o OD mínimo deveria ser 6 mg.L⁻¹.

Os resultados das 2 campanhas para a amostra do ponto A apresentaram valores de pH superiores ao permitido (9,03 e 8,78) e OD abaixo do permitido (3,53 e 3,91), o que indica uma baixa qualidade da água da lagoa neste ponto de coleta nos dias estudados.

Por este ponto se localizar na lagoa de Araruama, numa área em que há a confluência entre as águas da lagoa de Araruama e do rio Regamé, tendo este rio uma forte contribuição do efluente tratado da ETE Araruama, é possível levantar a hipótese de que a carga orgânica elevada proveniente do rio Regamé (conforme será visto mais adiante no item 5.4, através dos dados de nitrogênio e fósforo totais), esteja influenciando na qualidade da água da lagoa de Araruama.

Contudo, para que a hipótese supracitada seja comprovada, seria necessária a monitorização periódica neste e em outros pontos na lagoa de Araruama, para se estabelecer com clareza seus pontos críticos e a influência da entrada dos seus diversos afluentes.

Foi observado também que a primeira campanha gerou resultados, em geral, piores que a segunda. Isso pode estar relacionado à hipótese de maior volume de efluentes sanitários (tratados ou não) sendo gerados, uma vez que a primeira campanha foi realizada poucos dias após a ocorrência de feriado prolongado, em que se suspeita que há aumento populacional¹²⁶ já que se trata de região turística.

Em conjunto a esta hipótese, estariam as suspeitas de que as estações de tratamento de esgotos e efluentes doméstico da região seriam ineficientes ou com capacidade insuficiente para atender ao aumento populacional que ocorre em períodos de feriado ou de alta temporada do turismo na região.

5.4 – Análises de DQO e de nitrogênio e fósforo totais

Os resultados das análises de DQO e de nitrogênio e fósforo totais estão expressos nos quadros 15 (primeira campanha) e 16 (segunda campanha).

Quadro 15 - Resultados das análises de DQO e de nitrogênio e fósforo totais para amostras da primeira campanha

Amostra	Nitrogênio Total		Fósforo Total		Demanda Química de Oxigênio	
	média (mg/L)	DP	média (mg/L)	DP	média (mg/L)	DP
A	3,39	0,385	0,16	0,037	3,04	1,54
B	3,71	1,540	0,29	0,037	4,13	1,84
C	25,94	1,540	8,70	1,758	44,35	0,31
D	12,67	1,680	4,66	0,979	23,70	3,07
E	2,30	0,245	3,01	0,008	33,26	1,84

Quadro 16 – Resultados das análises de DQO e de nitrogênio e fósforo totais para amostras da segunda campanha

Amostra	Nitrogênio Total		Fósforo Total		Demanda Química de Oxigênio	
	média (mg/L)	DP	média (mg/L)	DP	média (mg/L)	DP
A	0,07	0,105	0,77	0,098	3,48	2,15
B	2,20	0,105	0,53	0,012	15,43	1,23
C	2,35	0,245	0,53	0,045	27,83	0,31
D	8,81	0,560	2,07	0,110	18,70	2,15
E	3,22	0,070	0,62	0,090	31,09	1,23

Esses 3 parâmetros são indicadores de eutrofização dos corpos hídricos, sendo possível notar que as amostras da primeira campanha, em geral, apresentam resultados piores que as da segunda em todos os pontos de coleta, exceto para os pontos A e B, em que os parâmetros DQO e fósforo total da segunda campanha foram piores que da primeira.

Da mesma maneira que no item 5.3, a explicação deste fato pode estar relacionada à hipótese de maior volume de efluentes sanitários (tratados ou não) sendo gerados após a ocorrência do feriado, influenciando os resultados da primeira campanha.

Os pontos de coleta C (coletada no rio Regamé, que recebe o efluente tratado da ETE Araruama) e D (efluente tratado coletado em frente a ETE Cabo Frio) foram os que apresentaram, em geral, maiores valores desses 3 parâmetros, indicando maior eutrofização nesses locais.

Esses 2 pontos são os das cidades mais populosas da região, conforme mostra a tabela 5, no item 4.4, e corroborariam a hipótese de que as 2 ETES seriam ineficientes ou com capacidade insuficiente para atender ao tratamento do esgoto sanitário da população desses municípios, com o agravamento deste quadro em épocas de feriado ou alta temporada de turismo.

Em relação ao parâmetro fósforo total, a resolução CONAMA 357/2005¹²⁵ estabelece a concentração limite de 0,05 mg.L⁻¹ para águas doces de ambiente lântico (ao qual poderia ser enquadrado o Rio Regamé, no ponto C) e 0,062 mg.L⁻¹ para água salina (como a do ponto A), sendo que foi detectado, conforme mostram os quadros 15 e 16, os valores de 0,16 e 0,098 mg.L⁻¹ para o ponto A e 8,70 e 0,53 mg.L⁻¹ para o ponto C na primeira e segunda campanha, respectivamente.

Dessa forma, em relação a esse parâmetro, os 2 pontos estariam em não conformidade com a legislação nacional, o que indicaria uma considerável eutrofização nesses locais, possivelmente causada por grande aporte de matéria orgânica, ao qual pode ser originada de esgotos domésticos não tratado ou tratados ineficazmente.

Os resultados obtidos neste trabalho, indicando uma preocupante eutrofização da lagoa de Araruama (expresso no ponto de coleta A) e em seus afluentes (que apresentam em sua composição os efluentes tratados de ETES da região), corroboram os resultados encontrados por outros os estudos realizados neste mesmo ecossistema^{127, 118, 128}, relacionando uma piora gradativa, desde o final da década de 1990, da qualidade das águas da referida lagoa e sua mudança de estado oligotrófico para hipertrófico.

Essa situação seria também agravada pela lenta taxa de renovação das águas da lagoa, problema que estaria relacionada a especulação imobiliária crescente de suas margens, fazendo com que exista, atualmente, apenas um canal (o canal de Itajuru) que permite as trocas de águas entre o Oceano e a referida lagoa¹¹⁸.

Uma possível solução a médio-longo prazo seria o lançamento dos efluentes tratados pelas ETES da região na bacia do Rio Una (situada em zona rural de Cabo Frio) ao invés do lançamento na Lagoa de Araruama, algo que já é feito pela ETE Jardim Esperança, em Cabo Frio¹¹⁹.

Neste sentido, existe um estudo¹²⁹ que defende que estações de tratamento secundário e lagoas de estabilização que despejam seus efluentes tratados na Lagoa de

Araruama agravam o problema da eutrofização da mesma, e esse argumento se fundamentaria no fato de que as ETEs instaladas promoveriam diminuição da demanda biológica de oxigênio (DBO), mas não eliminariam o nitrogênio e o fósforo inorgânicos. Esses nutrientes, lançados em ambientes costeiros de baixa circulação e troca das águas, como a lagoa de Araruama, promoveriam aceleração do crescimento de macro algas e fitoplâncton.

Esse fenômeno estaria relacionado ao fato de, ao diminuir o DBO dos esgotos, as espécies orgânicas contendo nitrogênio e fósforo (presentes nesses efluentes) seriam mineralizadas à espécies inorgânicas de nitrogênio e fósforo, que seriam mais facilmente absorvidas por algas, gerando um possível cenário de grave impacto ambiental.

5.5 – Análises das amostras ambientais dos pontos de coleta por GC-MS

Ao se analisar os resultados das amostras reais, expostos no quadro 17, é possível notar que os resultados obtidas nas 2 campanhas foram distintos.

Quadro 17 – Resultados das análises de amostras ambientais para as 2 campanhas.

17-B ESTRADIOL			
Ponto de Coleta/Campanha	Concentração média encontrada (ng.l⁻¹)	CV%	Análise do Resultado
Ponto A campanha 1	5,89	9,21	< 18,09 ng.l ⁻¹ (LD)
Ponto B campanha 1	9,73	5,30	< 18,09 ng.l ⁻¹ (LD)
Ponto C campanha 1	22,68	3,02	> 18,09 ng.l ⁻¹ (LD)
Ponto D campanha 1	23,12	3,83	> 18,09 ng.l ⁻¹ (LD)
Ponto E campanha 1	10,50	7,66	< 18,09 ng.l ⁻¹ (LD)
Ponto A campanha 2	3,23	7,94	< 18,09 ng.l ⁻¹ (LD)
Ponto B campanha 2	13,85	2,04	< 18,09 ng.l ⁻¹ (LD)
Ponto C campanha 2	14,33	8,57	< 18,09 ng.l ⁻¹ (LD)
Ponto D campanha 2	15,81	3,99	< 18,09 ng.l ⁻¹ (LD)
Ponto E campanha 2	11,84	3,63	< 18,09 ng.l ⁻¹ (LD)
17-α ETINILESTRADIOL			
Ponto de Coleta/Campanha	Concentração média encontrada (ng.l⁻¹)	CV%	Análise do Resultado
Ponto A campanha 1	1,92	7,63	< 23,87 ng.l ⁻¹ (LD)
Ponto B campanha 1	17,71	4,82	< 23,87 ng.l ⁻¹ (LD)

Continuação Quadro 17			
17-α ETINILESTRADIOL			
Ponto de Coleta/Campanha	Concentração média encontrada (ng.l⁻¹)	CV%	Análise do Resultado
Ponto C campanha 1	15,14	6,48	< 23,87 ng.l ⁻¹ (LD)
Ponto D campanha 1	27,18	2,85	> 23,87 ng.l⁻¹ (LD)
Ponto E campanha 1	10,18	6,34	< 23,87 ng.l ⁻¹ (LD)
Ponto A campanha 2	2,84	8,17	< 23,87 ng.l ⁻¹ (LD)
Ponto B campanha 2	16,11	4,03	< 23,87 ng.l ⁻¹ (LD)
Ponto C campanha 2	14,34	6,77	< 23,87 ng.l ⁻¹ (LD)
Ponto D campanha 2	18,72	4,55	< 23,87 ng.l ⁻¹ (LD)
Ponto E campanha 2	9,47	6,32	< 23,87 ng.l ⁻¹ (LD)
ESTRONA			
Ponto de Coleta/Campanha	Concentração média encontrada (ng.l⁻¹)	CV%	Análise do Resultado
Ponto A campanha 1	3,02	7,98	< 18,89 ng.l ⁻¹ (LD)
Ponto B campanha 1	12,81	5,08	<18,89 ng.l ⁻¹ (LD)
Ponto C campanha 1	23,04	4,34	> 18,89 ng.l⁻¹ (LD)
Ponto D campanha 1	24,62	3,77	> 18,89 ng.l⁻¹ (LD)
Ponto E campanha 1	10,27	5,82	< 18,89 ng.l ⁻¹ (LD)
Ponto A campanha 2	4,83	6,24	< 18,89 ng.l ⁻¹ (LD)
Ponto B campanha 2	11,02	4,66	< 18,89 ng.l ⁻¹ (LD)
Ponto C campanha 2	14,62	3,36	< 18,89 ng.l ⁻¹ (LD)
Ponto D campanha 2	13,73	5,07	< 18,89 ng.l ⁻¹ (LD)
Ponto E campanha 2	7,12	8,15	< 18,89 ng.l ⁻¹ (LD)

Em ambas as campanhas, não se obteve nenhum ponto que tenha concentração acima do limite de quantificação. Isso pode ter sido ocasionado por diversos fatores, tais como os valores de LQ do método terem sido altos para as 3 substâncias, perdas decorrentes do processo de filtração e extração, e também o fato de que os 5 pontos de coleta possuem natureza lântica. Os ambientes lânticos favorecem a deposição de substâncias lipofílicas (como os estrogênios) nos sedimentos, matrizes que, infelizmente, não puderam ser analisados neste trabalho.

Entretanto, na primeira campanha, é mostrado que os pontos de coleta C (rio regamé, que recebe o efluente tratado da ETE de Araruama) e D (efluente tratado de Cabo Frio) tiveram concentrações acima do limite de identificação para estrona e 17- β estradiol, no ponto C, e para os 3 estrogênios, no ponto D.

Isso indica que os respectivos estrogênios estão presentes nesses ambientes, embora o método não seja sensível o suficiente, em termos quantitativos, para expressar a concentração exata dos mesmos.

As concentrações em que foram detectados, acima do LD (que vai de cerca de 19 ng.L^{-1} para 17- β estradiol e estrona e de 23 ng.L^{-1} para 17- α etinilestradiol), porém abaixo do LQ (28,65 ng.L^{-1} para 17- β estradiol, 33,00 ng.L^{-1} para 17- α etinilestradiol e 36,25 ng.L^{-1} para estrona) são relativamente elevadas, tendo em vista as concentrações encontradas em diferentes matrizes aquáticas no mundo e no Brasil, expostas nas tabelas 2 e 3, presentes nas páginas 12 e 13 deste trabalho.

Essas concentrações estão bem acima dos PNECs relatados de 0,35 ng.L^{-1} para 17- α etinilestradiol⁹⁰ e do PNEC de 0,1 ng.L^{-1} para 17- α etinilestradiol, 1,0 ng.L^{-1} para 17- β estradiol e entre 3,0 e 5,0 ng.L^{-1} para estrona⁸⁹.

As concentrações de 17- α etinilestradiol identificadas também produziram prejuízos a fecundidade de peixes⁶⁹ e poderiam interferir na diferenciação sexual e novamente na fecundidade de peixes⁶⁸.

Os resultados obtidos para os estrogênios podem indicar um possível cenário de impacto à biota residente na lagoa de Araruama e dos córregos que recebem os efluentes tratados, podendo até mesmo influenciar na diminuição do volume e número de espécies, afetando a biodiversidade do ecossistema.

Esse impacto pode inclusive ser socioeconômico, visto que a possibilidade de diminuição de coleta de pescado e frutos do mar influenciaria a renda de um grande número de pescadores da região e suas famílias.

Esses resultados também, de certa forma, corroboram os encontrados para as análises dos parâmetros de eutrofização (item 5.2), ao qual os pontos C e D obtiveram os piores resultados e estes ocorreram na primeira campanha.

Tendo em vista que a primeira campanha ocorreu poucos dias depois de um longo feriado e que não houveram grandes diferenças nos dados meteorológicos entre as 2 campanhas (conforme exposto no quadros 9 no item 5.1), é possível levantar a hipótese de que um possível aumento populacional na região de estudo, acompanhada de ETEs ineficientes ou com capacidade insuficiente para tratar o esgoto doméstico, possam estar envolvidos na explicação dos resultados distintos entre as campanhas.

Todavia, outros fatores desconhecidos ou ignorados que justifiquem esses achados não podem ser descartados.

5.6– Análises das amostras reais por imunoenensaio

Os resultados das amostras reais para o analito 17- α etinilestradiol obtidos na primeira e segunda campanha são apresentados nos quadros 18 e 19, respectivamente.

Quadro 18 – Resultados da metodologia ELISA para as amostras reais da primeira campanha.

Amostra	média	desvio padrão	variância	CV	Concentração Estimada ($\mu\text{g.l}^{-1}$)
A não fortificada	1,3730	0,0062	0,0000	0,4548	0,0332
B não fortificada	1,3540	0,0079	0,0001	0,5862	0,0341
C não fortificada	1,2343	0,0443	0,0020	3,5879	0,0406
D não fortificada	1,2613	0,0291	0,0008	2,3105	0,0389
E não fortificada	1,3173	0,0172	0,0003	1,3090	0,0359

Quadro 19 – Resultados da metodologia ELISA para as amostras reais da segunda campanha.

Amostra	média	desvio padrão	variância	CV	Concentração Estimada ($\mu\text{g.l}^{-1}$)
A não fortificada	1,3827	0,0047	0,0000	0,3418	0,0328
B não fortificada	1,3627	0,0040	0,0000	0,2966	0,0337
C não fortificada	1,2640	0,0285	0,0008	2,2558	0,0388
D não fortificada	1,2887	0,0085	0,0001	0,6600	0,0374
E não fortificada	1,3227	0,0185	0,0003	1,3989	0,0356

Foi observado que todas as amostras reais, das 2 campanhas, tiveram resultado abaixo do limite de quantificação do método, que é de $0,05 \mu\text{g.l}^{-1}$ ou 50 ng.l^{-1} .

Isso demonstra que o método não foi sensível o suficiente, em termos quantitativos, para gerar resultados confiáveis da concentração de 17- α etinilestradiol na região de estudo.

Os resultados da primeira campanha geraram concentrações levemente maiores que os da segunda campanha, tendo também os pontos C e D com maiores concentrações, corroborando, de certa forma, com os resultados encontrados nos outros parâmetros.

5.7 – Limitações do trabalho e sugestões para pesquisas futuras

No que tange a limitações deste trabalho, primeiramente não foi possível a execução de testes de reprodutibilidade interlaboratorial.

Outra limitação estaria relacionada a necessidade de se analisar os pontos de coleta em regime de monitorização ambiental, fazendo campanhas mensais ou quinzenais ao longo de 12 meses, englobando principalmente coletas após intensas chuvas na região, e confrontando os resultados em tempo seco e chuvoso.

Os resultados deste trabalho também podem servir de alerta para que haja uma otimização dos sistemas de tratamento de esgoto e águas pluviais da região, e também para que se repense a questão do lançamento dos efluentes tratados na Lagoa de Araruama, uma vez que existem propostas de lançamentos dos mesmos na bacia do Rio Una, local que possivelmente seria mais apropriado para recebê-los.

Para estudos futuros, é sugerido o uso de sedimento da lagoa e a utilização de testes *in vivo* e *in vitro* para caracterizar o potencial estrogênico dos afluentes e da própria lagoa de Araruama.

6 – CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo deste trabalho, foram promovidas, através de 2 campanhas em meses distintos, a caracterização físico-química e também determinações de estrogênios (por imunoenensaio enzimático ou por GC-MS) em amostras de afluentes da Lagoa de Araruama, sendo estes afluentes geralmente compostos por efluentes tratados de estações de tratamento de esgoto que desembocam na lagoa de Araruama-RJ.

Foi empreendida a validação de método GC-MS para determinação de estrogênios em amostras de afluentes, de acordo com orientações do guia do INMETRO para Validação de Métodos de Ensaio Químicos¹¹¹. O método foi otimizado e validado com êxito, obtendo LD de 18,09, 23,87 e 18,89 ng.l^{-1} e LQ de 28,65, 33,00 e 36,25 ng.L^{-1} para 17 β -estradiol, 17- α etinilestradiol e estrona, respectivamente.

O método cromatográfico apresentou maior sensibilidade que a metodologia ELISA monoclonal validada pela USEPA, apresentando LQ mais baixo que o referido imunoenensaio.

Os resultados dos parâmetros físico-químicos e de eutrofização mostram que a qualidade da água na primeira campanha (em novembro, poucos dias após um feriado prolongado na cidade) estava pior que na segunda campanha (ocorrida em dezembro).

Isto é corroborado pelos dados de oxigênio dissolvido abaixo de 6 mg/l em todos os pontos de coleta na primeira campanha e, no que tange a águas salinas (como a do ponto A), em desconformidade com a legislação brasileira atual (resolução CONAMA número 357/2005¹²⁵).

Foi observado ainda que os valores de DQO, nitrogênio e fósforo totais foram, em geral, maiores nos pontos de coleta C (efluente tratado da estação de tratamento de esgotos e efluentes de Araruama) e D (efluente tratado da estação de tratamento de esgotos e efluentes de Cabo Frio).

Os resultados cromatográficos para o analito 17- α etinilestradiol foram comparados com os obtidos por metodologia por imunoenensaio ELISA monoclonal, cujo LQ é de 50 ng.l^{-1} .

Para as amostras analisadas, não se obteve concentrações acima do limite de quantificação para este analito em nenhum dos 2 métodos, fato que pode estar relacionado à deficiências da metodologia (expressas em um alto LQ) ou na natureza lântica dos pontos de coleta, que poderia favorecer a deposição de estrogênios no sedimento, em virtude da lipofilia destas substâncias.

Entretanto, no método cromatográfico, é relatado que, na primeira campanha, os pontos de coleta C e D tiveram concentrações pouco acima do limite de identificação para estrona e 17- β estradiol, ponto C, e para os 3 estrogênios no ponto D.

Esses resultados mostram que os respectivos estrogênios estão presentes nessas amostras, podendo produzir efeitos reprodutivos na biota residente nos córregos e na lagoa de Araruama, sobretudo em peixes, podendo gerar impacto socioeconômico aos pescadores da região.

É possível levantar a hipótese de que um possível aumento populacional na região de estudo (em virtude de um feriado ocorrido pouco antes da primeira campanha), assim como a existência de ETEs ineficientes ou com capacidade insuficiente para tratar o esgoto doméstico da região, possam estar envolvidas na explicação dos resultados distintos entre as campanhas, embora outros fatores desconhecidos ou ignorados que justifiquem esses achados não possam ser descartados.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Birkett JW, Lester JN, editors. *Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes*. 1st ed. CRC Press; 2002.
2. Ternes T., Kreckel P, Mueller J. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants — II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Science of The Total Environment*. 1999;225(1-2):91-9.

3. Christensen FM. Pharmaceuticals in the Environment—A Human Risk? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 1998;28(3):212–21.
4. Colborn T, Dumanoski D, Meyers JP. *Our Stolen Future: Are We Threatening Our Fertility, Intelligence, and Survival?--A Scientific Detective Story*. Plume; 1997.
5. Singleton DW, Khan SA. Xenoestrogen exposure and mechanisms of endocrine disruption. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*. 2003;8:110–118.
6. Davis DL, Bradlow HL, Wolff M, Woodruff T, Hoel DG, Anton-Culver H. Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environmental Health Perspectives*. 1993;101(5):372–7.
7. Fernandez SV, Russo J. Estrogen and Xenoestrogens in Breast Cancer. *Toxicologic Pathology* 2010;38(1):110–22.
8. Wetherill YB, Fisher NL, Staubach A, Danielsen M, De Vere White RW, Knudsen KE. Xenoestrogen Action in Prostate Cancer: Pleiotropic Effects Dependent on Androgen Receptor Status. *Cancer Research*. 2005;65(1):54–65.
9. Desbrow C, Routledge EJ, Brighty GC, Sumpter JP, Waldock M. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. *Environmental Science Technology*. 1998;32(11):1549–58.
10. Bidegain P, Bizerril C. Lagoa de Araruama - Perfil Ambiental do Maior Ecosistema Lagunar Hipersalino do Mundo. Secretaria de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável do Estado do Rio de Janeiro; 2002.
11. Koeppen BM, Stanton BA. *Berne & Levy Physiology*, 6th Updated Edition, with Student Consult Online Access. 6th ed. Mosby; 2009.
12. Brunton L, Chabner B, Knollman B. Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Twelfth Edition. 12th ed. McGraw-Hill Professional; 2010.

13. Ryan KJ. Biochemistry of aromatase: significance to female reproductive physiology. *Cancer Research*. 1982;42(8 Suppl):3342s–3344s.
14. Mechoulam R, Brueggemeier RW, Denlinger DL. Estrogens in insects. *Experientia*. 1984;40(9):942–4.
15. Nef S, Parada LF. Hormones in male sexual development. *Genes & Development*. 2000;14(24):3075–86.
16. Simpson ER. Sources of estrogen and their importance. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2003;86(3-5):225–30.
17. Zacharewski. In Vitro Bioassays for Assessing Estrogenic Substances. *Environmental Science Technology*. 1997;31(3):613–23.
18. Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, *et al.* Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. 1996;715–40.
19. Ostby J, Cooper RL, Kelce WR, Gray LE. The Estrogenic and Antiandrogenic Pesticide Methoxychlor Alters the Reproductive Tract and Behavior Without Affecting Pituitary Size or LH and Prolactin Secretion in Male Rats. *Toxicology and Industrial Health*. 1999;15(1-2):37–47.
20. Wilkinson CF, Lamb IV JC. The Potential Health Effects of Phthalate Esters in Children's Toys: A Review and Risk Assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 1999;30(2):140–55.
21. Hartmann S, Lacorn M, Steinhart H. Natural occurrence of steroid hormones in food. *Food Chemistry*. 1998;62(1):7–20.
22. Santodonato J. Review of the estrogenic and antiestrogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons: relationship to carcinogenicity. *Chemosphere*. 1997;34(4):835–48.

23. Bila DM. Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17 beta-estradiol pelo processo de ozonização. [Internet] [Tese de Doutorado]. [Rio de Janeiro, RJ, Brasil]: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2005 [Acesso em 01 de outubro de 2012]. Disponível em: http://teses.ufrj.br/COPPE_D/DanieleMaiaBila.pdf
24. Allen E, Doisy EA. An Ovarian Hormone: Preliminary report on its Localization, extraction and partial purification, and action in test animals. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 1923;81(10):819–21.
25. Herbst AL, Ulfelder H, Poskanzer DC. Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *The New England Journal of Medicine*. 1971;284(15):878–81.
26. Carson R. *Silent Spring*. Houghton Mifflin Harcourt; 1962.
27. Markey CM, Rubin BS, Soto AM, Sonnenschein C. Endocrine disruptors: from Wingspread to environmental developmental biology. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2002;83(1-5):235–44.
28. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *British Medical Journal*. 1992;305(6854):609–13.
29. United States Environment Protection Agency. Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) home page. [Internet]. Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP). [acesso em 24 de junho de 2012]. Disponível em: <http://www.epa.gov/endo/>
30. Bila DM, Dezotti M. Pharmaceutical drugs in the environment. *Química Nova*. 2003;26(4):523–30.
31. Câmara V. *Textos de Epidemiologia para Vigilância Ambiental em Saúde*. Assessoria de Comunicação e Educação em Saúde - Ascom/Pre/FUNASA; 2002.
32. Freitas CM de. Avaliação de riscos como ferramenta para a vigilância ambiental em Saúde. *Informe Epidemiológico do Sus*. 2002;11(4):227–39.

33. United States Environment Protection Agency (U.S. EPA). Step 2 - Dose-Response Assessment | Risk Assessment Portal | US EPA [Internet]. [acesso em 18 de fevereiro de 2013]. Disponível em: <http://www.epa.gov/risk/dose-response.htm>
34. Lai KM, Scrimshaw MD, Lester JN. The effects of natural and synthetic steroid estrogens in relation to their environmental occurrence. *Critical reviews in toxicology*. 2002;32(2):113–32.
35. Ying G-G, Kookana RS, Ru Y-J. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International*. 2002;28(1):545–51.
36. Huber MM, Canonica S, Park G-Y, von Gunten U. Oxidation of Pharmaceuticals during Ozonation and Advanced Oxidation Processes. *Environmental Science & Technology*. 2003;37(5):1016–24.
37. Baronti C, Curini R, D’Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, Samperi R. Monitoring Natural and Synthetic Estrogens at Activated Sludge Sewage Treatment Plants and in a Receiving River Water. *Environmental Science & Technology*. 2000;34(24):5059–66.
38. Coleman HM, Routledge EJ, Sumpter JP, Eggins BR, Byrne JA. Rapid loss of estrogenicity of steroid estrogens by UVA photolysis and photocatalysis over an immobilised titanium dioxide catalyst. *Water Research*. 2004;38(14-15):3233–40.
39. D’Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, Mancini R, Mastropasqua R, Nazzari M, *et al.* Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Science of The Total Environment*. 2003;302(1–3):199–209.
40. Johnson A., Belfroid A, Di Corcia A. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Science of The Total Environment*. 2000;256(2–3):163–73.
41. Melamed M, Castaño E, Notides AC, Sasson S. Molecular and kinetic basis for the mixed agonist/antagonist activity of estriol. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*. 1997;11(12):1868–78.

42. Brzozowski AM, Pike ACW, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engström O, *et al.* Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*. 1997;389(6652):753–8.
43. Gaido KW, Leonard LS, Lovell S, Gould JC, Babai D, Portier CJ, *et al.* Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1997;143(1):205–12.
44. Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano FO. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*. 1995;103(Suppl 7):113–22.
45. Routledge EJ, Sumpter JP. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1996;15(3):241–8.
46. Ockrim JL, Lalani E-N, Kakkar AK, Abel PD. Transdermal estradiol therapy for prostate cancer reduces thrombophilic activation and protects against thromboembolism. *The Journal of urology*. 2005;174(2):527–533; discussion 532–533.
47. Carruba G, Pfeffer U, Fecarotta E, Coviello DA, D'Amato E, Casto ML, *et al.* Estradiol Inhibits Growth of Hormone-nonresponsive PC3 Human Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*. 1994;54(5):1190–3.
48. Grosse Y, Baan R, Straif K, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, *et al.* A review of human carcinogens—Part A: pharmaceuticals. *The Lancet Oncology*. 2009;10(1):13–4.
49. Coglianò V, Grosse Y, Baan R, Straif K, Secretan B, Elghissassi F. Carcinogenicity of combined oestrogen-progestagen contraceptives and menopausal treatment. *The Lancet Oncology*. 2005;6(8):552–3.

50. Sharpe RM, Skakkebaek NE. Male reproductive disorders and the role of endocrine disruption: Advances in understanding and identification of areas for future research. *Pure and Applied Chemistry*. 2003;75(11/12):2023–38.
51. Chasan-Taber L, Willett WC, Manson JE, Spiegelman D, Hunter DJ, Curhan G, *et al*. Prospective study of oral contraceptives and hypertension among women in the United States. *Circulation*. 1996;94(3):483–9.
52. Uhler ML, Marks JW, Judd HL. Estrogen replacement therapy and gallbladder disease in postmenopausal women. *Menopause*. 2000;7(3):162–7.
53. Oelkers W, Foidart JM, Dombrovicz N, Welter A, Heithecker R. Effects of a new oral contraceptive containing an antimineralocorticoid progestogen, drospirenone, on the renin-aldosterone system, body weight, blood pressure, glucose tolerance, and lipid metabolism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1995;80(6):1816–21.
54. Stumpf M, Ternes TA, Wilken R-D, Silvana Vianna Rodrigues, Baumann W. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Science of The Total Environment*. 1999;225(1–2):135–41.
55. Ternes TA, Andersen H, Gilberg D, Bonerz M. Determination of Estrogens in Sludge and Sediments by Liquid Extraction and GC/MS/MS. *Analytical Chemistry*. 2002;74(14):3498–504.
56. Froehner S, Machado KS, Stefen E, Nolasco M. Occurrence of Sexual Hormones in Sediments of Mangrove in Brazil. *Water, Air, & Soil Pollution*. 2011;219(1-4):591–9.
57. Matthiessen P, Arnold D, Johnson AC, Pepper TJ, Pottinger TG, Pulman KGT. Contamination of headwater streams in the United Kingdom by oestrogenic hormones from livestock farms. *Science of The Total Environment*. 2006;367(2–3):616–30.
58. Ferreira MGM. Remoção da atividade estrogênica de 17-beta estradiol e 17-alpha etinilestradiol pelos processos de ozonização e O₃/H₂O₂ [Internet]. [Rio de Janeiro, RJ,

Brasil]: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2008 [acesso em 01 de outubro de 2012]. Disponível em: http://teses.ufrj.br/COPPE_D/MilenaGuedesManieroFerreira.pdf

59. Kuch HM, Ballschmiter K. Determination of Endocrine-Disrupting Phenolic Compounds and Estrogens in Surface and Drinking Water by HRGC-(NCI)-MS in the Picogram per Liter Range. *Environmental Science & Technology*. 2001;35(15):3201-6.

60. Gerolin ERR. Ocorrência e remoção de disruptores endócrinos em águas utilizadas para abastecimento público de Campinas e Sumaré - São Paulo [Internet]. [Campinas, SP, Brasil]: Universidade Estadual de Campinas; 2008 [acesso em 18 de fevereiro de 2013]. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?view=vtls000423574>

61. Kuster M, Azevedo DA, López de Alda MJ, Aquino Neto FR, Barceló D. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). *Environment International*. 2009;35(7):997-1003.

62. Verbinnen RT, Nunes GS, Vieira EM. Determination of estrogens in drinking water using HPLC-DAD. *Química Nova*. 2010;33(9):1837-42.

63. Cargouët M, Perdiz D, Mouatassim-Souali A, Tamisier-Karolak S, Levi Y. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Science of The Total Environment*. 2004 May 25;324(1-3):55-66.

64. Xiao XY, McCalley DV, McEvoy J. Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography-negative chemical ionisation mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives. *Journal of chromatography. A*. 2001;923(1-2):195-204.

65. Beck I-C, Bruhn R, Gandrass J. Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen. *Chemosphere*. 2006;63(11):1870-8.

66. Snyder SA, Keith TL, Verbrugge DA, Snyder EM, Gross TS, Kannan K, *et al.* Analytical Methods for Detection of Selected Estrogenic Compounds in Aqueous Mixtures. *Environmental Science Technology*. 1999;33(16):2814–20.
67. Jürgens MD, Holthaus KIE, Johnson AC, Smith JLL, Hetheridge M, Williams RJ. The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in english rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2002;21(3):480–8.
68. Purdom CE, Hardiman PA, Bye VVJ, Eno NC, Tyler CR, Sumpter JP. Estrogenic Effects of Effluents from Sewage Treatment Works. *Chemistry and Ecology*. 1994;8(4):275–85.
69. Nash JP, Kime DE, Van der Ven LTM, Wester PW, Brion F, Maack G, *et al.* Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethinylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environmental Health Perspectives*. 2004;112(17):1725–33.
70. Schmid T, Gonzalez-Valero J, Ruffli H, Dietrich DR. Determination of vitellogenin kinetics in male fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Toxicology letters*. 2002;131(1-2):65–74.
71. Routledge EJ, Sheahan D, Desbrow C, Brighty GC, Waldock M, Sumpter JP. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and Roach. *Environmental Science & Technology*. 1998;32(11):1559–65.
72. Chen P-J, Rosenfeldt EJ, Kullman SW, Hinton DE, Linden KG. Biological assessments of a mixture of endocrine disruptors at environmentally relevant concentrations in water following UV/H₂O₂ oxidation. *The Science of the Total Environment*. 2007;376(1-3):18–26.
73. Brian JV, Harris CA, Scholze M, Backhaus T, Booy P, Lamoree M, *et al.* Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals. *Environ. Health Perspect*. 2005;113(6):721–8.

74. Rose J, Holbech H, Lindholst C, Nørum U, Povlsen A, Korsgaard B, *et al.* Vitellogenin induction by 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2002;131(4):531–9.
75. Folmar, Hemmer, Hemmer, Bowman, Kroll, Denslow. Comparative estrogenicity of estradiol, ethynyl estradiol and diethylstilbestrol in an in vivo, male sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*), vitellogenin bioassay. *Aquatic toxicology*. 2000;49(1-2):77–88.
76. Robinson CD, Brown E, Craft JA, Davies IM, Moffat CF, Pirie D, *et al.* Effects of sewage effluent and ethynyl oestradiol upon molecular markers of oestrogenic exposure, maturation and reproductive success in the sand goby (*Pomatoschistus minutus*, Pallas). *Aquatic toxicology*. 2003;62(2):119–34.
77. Vosges M, Braguer J-C, Combarous Y. Long-term exposure of male rats to low-dose ethinylestradiol (EE2) in drinking water: Effects on ponderal growth and on litter size of their progeny. *Reproductive Toxicology*. 2008;25(2):161–8.
78. Parrott JL, Blunt BR. Life-cycle exposure of fathead minnows (*Pimephales promelas*) to an ethinylestradiol concentration below 1 ng/L reduces egg fertilization success and demasculinizes males. *Environmental toxicology*. 2005;20(2):131–41.
79. Panter G., Thompson R., Sumpter J. Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. *Aquatic Toxicology*. 1998;42(4):243–53.
80. Irwin LK, Gray S, Oberdörster E. Vitellogenin induction in painted turtle, *Chrysemys picta*, as a biomarker of exposure to environmental levels of estradiol. *Aquatic toxicology*. 2001;55(1-2):49–60.
81. Rodgers-Gray TP, Jobling S, Kelly C, Morris S, Brighty G, Waldock MJ, *et al.* Exposure of Juvenile Roach (*Rutilus rutilus*) to Treated Sewage Effluent Induces Dose-

Dependent and Persistent Disruption in Gonadal Duct Development. *Environmental Science & Technology*. 2001;35(3):462–70.

82. Koger CS, Teh SJ, Hinton DE. Determining the sensitive developmental stages of intersex induction in medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 beta-estradiol or testosterone. *Marine environmental research*. 2000;50(1-5):201–6.

83. Knörr S, Braunbeck T. Decline in reproductive success, sex reversal, and developmental alterations in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) after continuous exposure to octylphenol. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2002;51(3):187–96.

84. Panter GH, Thompson RS, Sumpter JP. Intermittent Exposure of Fish to Estradiol. *Environmental Science & Technology*. 2000;34(13):2756–60.

85. Hartley WR, Thiagarajah A, Anderson MB, Broxson MW, Major SE, Zell SI. Gonadal development in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 β -estradiol. *Marine Environmental Research*. 1998;46(1–5):145–8.

86. Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, *et al.* Effect of 17 β -estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*. 2002;47(1):71–80.

87. Shioda T, Wakabayashi M. Effect of certain chemicals on the reproduction of medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*. 2000;40(3):239–43.

88. Moncaut N, Nostro FL, Maggese MC. Vitellogenin detection in surface mucus of the South American cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) induced by estradiol-17beta. Effects on liver and gonads. *Aquatic toxicology*. 2003;63(2):127–37.

89. Young WF, Whitehouse P, Johnson I. Proposed Predicted-no-effect-concentrations (PNECs) for Natural and Synthetic Steroid Oestrogens in Surface Waters. *Environment Agency*; 2002.

90. Caldwell DJ, Mastrocco F, Hutchinson TH, Länge R, Heijerick D, Janssen C, et al. Derivation of an Aquatic Predicted No-Effect Concentration for the Synthetic Hormone, 17 α -Ethinyl Estradiol. *Environmental Science Technology*. 2008;42(19):7046–54.
91. Rothman KJ, Lash TL, Greenland S. *Modern Epidemiology*. Third, Mid-cycle revision. Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
92. Andersson AM, Skakkebaek NE. Exposure to exogenous estrogens in food: possible impact on human development and health. *European Journal of Endocrinology*. 1999;140(6):477–85.
93. Cao Q, Yu Q, Connell DW. Fate simulation and risk assessment of endocrine disrupting chemicals in a reservoir receiving recycled wastewater. *The Science of the Total Environment*. 2010;408(24):6243–50.
94. Webb S, Ternes T, Gibert M, Olejniczak K. Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water. *Toxicology Letters*. 2003;142(3):157–67.
95. Caldwell DJ, Mastrocco F, Nowak E, Johnston J, Yekel H, Pfeiffer D, et al. An Assessment of Potential Exposure and Risk from Estrogens in Drinking Water. *Environmental Health Perspectives*. 2009;118(3):338–44.
96. Baker VA. Endocrine disrupters--testing strategies to assess human hazard. *Toxicology In Vitro*. 2001;15(4-5):413–9.
97. Korach KS, McLachlan JA. Techniques for detection of estrogenicity. *Environmental Health Perspectives*. 1995;103(Suppl 7):5–8.
98. Körner W, Hanf V, Schuller W, Bartsch H, Zwirner M, Hagenmaier H. Validation and application of a rapid in vitro assay for assessing the estrogenic potency of halogenated phenolic chemicals. *Chemosphere*. 1998;37(9-12):2395–407.
99. Folmar LC, Hemmer MJ, Denslow ND, Kroll K, Chen J, Cheek A, et al. A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol,

nonylphenol and methoxychlor in vivo and in vitro. *Aquatic Toxicology*. 2002;60(1-2):101–10.

100. Brossa, Marcé RM, Borrull F, Pocurull E. Application of on-line solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry to the determination of endocrine disruptors in water samples. *Journal of Chromatography A*. 2002;963(1-2):287–94.

101. Hernando MD, Mezcua M, Gómez MJ, Malato O, Agüera A, Fernández-Alba AR. Comparative study of analytical methods involving gas chromatography–mass spectrometry after derivatization and gas chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of selected endocrine disrupting compounds in wastewaters. *Journal of Chromatography A*. 2004;1047(1):129–35.

102. Farré M, Brix R, Kuster M, Rubio F, Goda Y, López de Alda MJ, *et al.* Evaluation of commercial immunoassays for the detection of estrogens in water by comparison with high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry HPLC-MS/MS (QqQ). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2006;385(6):1001–11.

103. Buehler S, Willenberg Z, Dindal A, McKernan J. Environmental Technology Verification Report: Abraxis Ecologenia® Ethynylestradiol (EE2) Microplate Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Test Kits [Internet]. 2009. [Acesso em 02 de fevereiro de 2013]. Disponível em <http://www.epa.gov/etv/pubs/600r09126.pdf>

104. Vasco AN, Britto FB, Pereira APS, Mélo Júnior AV, Borges Garcia CA, Nogueira LC. Assessing the spatial and temporal water quality in the sub-basin of the Poxim river, Sergipe state, Brazil. *Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*. 2011;6(1):118–30.

105. Pereira P. Avaliação da integridade ecológica da água utilizando bioindicadores em rios da baixada litorânea e norte fluminense, Rio de Janeiro. [Internet]. [Rio de Janeiro, RJ, Brasil]: Fundação Osvaldo Cruz; 2012 [acesso em 02 de fevereiro de 2013]. Disponível em: <https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&ved=0CDIQFjAA&url=http%3A%2F%2Fbvssp.icict.fiocruz.br%2Flildb%2Fdocsonline%2Fget.php%3Fid%3D2831&ei=OpVoUa6ENKXj0gGevIGACg&usq=AFQjCNFKR>

h7iurzVJNQqYy2pGBnOci8Mog&sig2=_TleW-Pd-
RznkiPAgzyqA&bvm=bv.45175338,d.dmQ

106. Silva GS da, Jardim W de F. A new water quality index for protection of aquatic life applied to the Atibaia River, region of Campinas/Paulínia cities - São Paulo State. *Química Nova*. 2006;29(4):689–94.

107. Pessoa G de P, Santos AB dos, Souza NC de, Alves JAC, Nascimento RF do. Development of methodology to determine estrogens in wastewater treatment plants. *Química Nova*. 2012;35(5):968–73.

108. Ding W-H, Chiang C-C. Derivatization procedures for the detection of estrogenic chemicals by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2003;17(1):56–63.

109. Zuo Y, Zhang K, Lin Y. Microwave-accelerated derivatization for the simultaneous gas chromatographic-mass spectrometric analysis of natural and synthetic estrogenic steroids. *Journal of chromatography A*. 2007;1148(2):211–8.

110. Mansilha C, Melo A, Rebelo H, Ferreira IMPLVO, Pinho O, Domingues V, *et al.* Quantification of endocrine disruptors and pesticides in water by gas chromatography-tandem mass spectrometry. Method validation using weighted linear regression schemes. *Journal of chromatography. A*. 2010;1217(43):6681–91.

111. Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO). Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos (DOQ-CGCRE-008) [Internet]. 2007 [acesso em 02 de fevereiro de 2013]. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf

112. Souza SVC, Junqueira RG. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta*. 2005;552(1–2):25–35.

113. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. *Química Nova*. 2004;27(5):771–80.

114. Clescerl LS, Greenberg AE, Eaton AD, editors. Standard Methods for Examination of Water & Wastewater. 20th ed. American Public Health Association; 1999.
115. Gehring PAF, Santos OMM, Pereira GR, Araújo MB de, Bonfilio R. Establishment of dissolution test conditions for cinnarizine in pharmaceutical capsules using factorial design. *Química Nova*. 2011;34(3):455–61.
116. Zhang ZL, Hibberd A, Zhou JL. Optimisation of derivatisation for the analysis of estrogenic compounds in water by solid-phase extraction gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica chimica acta*. 2006;577(1):52–61.
117. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Informações demográficas de população residente no Rio de Janeiro [Internet]. População Residente - Rio de Janeiro. [acesso em 02 de fevereiro de 2013]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?ibge/cnv/poprj.def>
118. Vargas MC, De Lima RF de. Concessões Privadas de Saneamento no Brasil: Bom Negócio para quem? *Ambiente & Sociedade* [Internet]. 2004 [Acesso em 09 de abril de 2013];7(2). Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/asoc/v7n2/24688.pdf>
119. Jornal do Comitê da Bacia Hidrográfica Lagos São João. Rio Una: uma alternativa para o lançamento dos efluentes tratados fora da Lagoa de Araruama [Internet]. *Voz das Águas*. [Acesso em 02 de fevereiro de 2013]. Disponível em: <http://www.vozdasaguas.com/2011/08/rio-una-uma-alternativa-para-o-lancamento-dos-efluentes-tratados-fora-da-lagoa-de-araruama/>
120. Comitê de Bacias Lagos de São João. Mapa de Distribuição de Chuvas [Internet]. Comitê de Bacias Lagos de São João - Clima. [Acesso em 02 de fevereiro de 2013]. Disponível em: <http://www.lagossaojoao.org.br/nc-clima.htm>
121. Comitê da Bacia Hidrográfica Lagos São João (CBHLSJ). Recomeça o desassoreamento do Canal do Itajuru, ligação entre o mar e a Lagoa de Araruama [Internet]. *Jornal do Comitê da Bacia Hidrográfica Lagos São João*. [Acesso em 02 de fevereiro de 2013]. Disponível em: <http://www.vozdasaguas.com/2011/07/recomeca-o-desassoreamento-do-canal-do-itajuru-ligacao-entre-o-mar-e-a-lagoa-de-araruama/>

122. Instituto Nacional de Meteorologia. Estação Meteorológica de Observação de Superfície Automática [Internet]. 2012. [Acesso em 02 de fevereiro de 2013]. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=estacoes/estacoesAutomaticas>

123. Hach Company. Nitrogen, Total, Persulfate Digestion LR Method 10071, Spectrophotometer, Test 'N Tube™ Vials [Internet]. Hach Methods/Procedures downloads. 2012 [Acesso em 02 de fevereiro de 2013]. Disponível em: <http://www.hach.com/asset-get.download-en.jsa?id=7639983804>

124. Hach Company. Phosphorus, Total-PhosVer® with Acid Persulfate Digestion TNT Method 8190 [Internet]. Hach Methods/Procedures downloads. 2012 [Acesso em 02 de fevereiro de 2013]. Disponível em: <http://www.hach.com/asset-get.download.jsa?id=7639983838>

125. Brasil, Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução CONAMA nº 357 [Internet]. 2005. [Acesso em 02 de fevereiro de 2013]. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>

126. Portal R7. Feriado prolongado aumenta em 20% turismo na região dos Lagos - Rio de Janeiro [Internet]. 2011 [Acesso em 02 de fevereiro de 2013]. Disponível em: <http://noticias.r7.com/rio-de-janeiro/noticias/feriado-prolongado-aumenta-em-20-turismo-na-regiao-dos-lagos-20110422.html>

127. Guerra L. Processos microbiológicos e composição da matéria orgânica relacionados à eutrofização de uma lagoa costeira hipersalina, L. Araruama, RJ [Internet]. Universidade Federal Fluminense; 2008 [Acesso em 02 de fevereiro de 2013]. Disponível em: http://www.btdt.ndc.uff.br/tde_arquivos/8/TDE-2011-05-05T104008Z-2902/Publico/sert-leandoguerra.pdf

128. Mello T. Caracterização Biogeoquímica da Lagoa de Araruama, RJ. [Internet]. Universidade Federal Fluminense; 2007. [Acesso em 02 de fevereiro de 2013]. Disponível em: http://www.btdt.ndc.uff.br/tde_arquivos/8/TDE-2011-05-25T113751Z-2943/Publico/Dissertacao%20Mello%202007_noPW.pdf

129. Moreira A. A Eutrofização na Lagoa de Araruama e o Impacto Ambiental das Estações de Tratamento Secundário [Internet]. [Acesso em 02 de fevereiro de 2013]. Disponível em:
http://ambientes.ambientebrasil.com.br/agua/artigos_agua_salgada/a_eutrofizacao_na_lagoa_de_araruama_e_o_impacto_ambiental_das_estacoes_de_tratamento_secundario.html