



FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Paula Gomes Fonseca

Poluição estrogénica no ambiente: um problema de Saúde Pública

Dissertação de Doutoramento na área científica de Ciências da Saúde, ramo Ciências Biomédicas, orientada pelo Senhor Professor Catedrático Salvador Manuel Correia Massano Cardoso e co-orientada pelo Senhor Professor Auxiliar Valdemar Inocêncio Esteves e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Novembro 2012

Júri

Presidente:

Doutor Américo Manuel Costa Figueiredo, professor associado com agregação da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Vogais:

Doutor José Henrique Dias Pinto de Barros, professor catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

Doutor Jorge Manuel Torgal Dias Garcia, professor catedrático da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa.

Doutor José Manuel Domingos Pereira Miguel, professor catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

Doutor António Guilherme de Almeida Gonçalves, professor associado com agregação do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Doutora Maria de Fátima Calado Varela Reis, investigadora principal da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

Doutor Valdemar Inocêncio Esteves, professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Doutor Salvador Manuel Correia Massano Cardoso, professor catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Doutor Vítor José Lopes Rodrigues, professor associado com agregação da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

“O que sabemos é uma gota de água, o que ignoramos é um oceano”

(Isaac Newton)

“A ciência será sempre uma busca e jamais uma descoberta. É uma viagem, nunca uma chegada”

(Karl Popper)

“Todo o trabalho tem em si mesmo a sua misteriosa recompensa”

(Lerberghe)

Dedicatória

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, Zília e Abel

à minha irmã Carla

ao meu sobrinho Diogo

ao Zé

aos meus amigos

e à Sacha

com todo o meu amor e carinho

Dedico ainda esta dissertação, como uma pequena homenagem ao Professor Doutor João António Neves Gil, meu amigo e colega da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, que faleceu a 7 de Maio deste ano.

Um dos homens que me marcou quer profissionalmente, quer pessoalmente, pela sua imensa inteligência e capacidade, caráter, convicções, força, postura, garra, e com uma visão muito além do próximo futuro, uma referência a nível nacional para todos nós!

Um homem que deixou a sua marca em todas as coisas que fez, sem dúvida por ser diferente e único!

Pessoalmente um amigo, delicado, cavalheiro, sempre bem-humorado, bom ouvinte, simpático, alegre, entusiasta, carismático, ativo e até a dar uma rosa era diferente, porque apanhava e dava sempre uma por magia!

Foi um verdadeiro privilégio e uma honra tê-lo como bom amigo e colega de profissão!

Agradeço-lhe em tudo o que fez parte da minha vida e com toda a certeza que nunca o esquecerei e sempre o recordarei!

Até sempre Giljoooooooo



Agradecimentos

Ao longo deste trabalho, muitas são as pessoas a quem deixo o meu profundo agradecimento e reconhecimento por toda a colaboração, apoio, incentivo e amizade, quer nos bons momentos, quer nos menos bons, e seguramente sem as quais este trabalho não teria sido possível.

Ao meu orientador, Professor Catedrático Salvador Massano Cardoso, por todo o apoio, contributo, conhecimento, disponibilidade, incentivo, motivação, entusiasmo por este trabalho e amizade.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor Valdemar Inocêncio Esteves, por todo o apoio, conhecimento, contributo, sugestões, disponibilidade, motivação, paciência e amizade.

Ao Instituto Politécnico de Coimbra pelo apoio na Formação Avançada de docentes do Instituto Superior Politécnico, no âmbito do Programa PROTEC – 2ª edição.

À Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, a todos os docentes e funcionários não docentes, que diretamente e indiretamente me apoiaram, na pessoa do seu Presidente, Prof. Jorge Conde, por me terem permitido reunir condições no desenvolvimento deste trabalho, especialmente nos laboratórios afetos à licenciatura em Farmácia.

Aos Hospitais da Universidade de Coimbra, por me terem deixado utilizar equipamento e o Laboratório de Hormonologia e Monitorização de Fármacos na realização de uma parte deste trabalho, em particular aos colegas António Gabriel e António Metelo.

Ao Dr. José Miguel Oliveira do Instituto Pedro Nunes-PROTERRA21, por todo o apoio, disponibilidade, contributo e colaboração na captura e recolha de material biológico dos anfíbios estudados.

Aos colegas do Departamento de Farmácia, Professores Rui Cruz, João Joaquim, Jorge Balteiro e muito em particular à Professora Zélia Barbosa por toda a sua ajuda, apoio, paciência e amizade nos bons e maus momentos.

À colega e amiga Professora Diana Lima por toda a sua ajuda, apoio, colaboração em algumas fases deste trabalho, ensinamentos e amizade nos bons e maus momentos.

Às colegas e amigas Professoras Joana Santos, Alexandra André e Clara Rocha por todo o apoio e amizade que sempre tiveram nos bons e maus momentos.

Aos meus amigos desde “pequenina” e de sempre, Cláudia Sousa, Margarida Matias e Paulo Duarte, por fazerem parte da minha vida, sempre com muito carinho e amizade incondicional.

A todos os meus amigos e familiares, em particular, ao meu pai, à minha mãe, irmã e sobrinho por toda a amizade, compreensão e motivação.

Tem sido um prazer e uma honra ter amigos e colegas que ao longo destes anos me têm ajudado a crescer como pessoa em todos os aspetos da minha vida.

Muito obrigada a todos!

Índice

Índice de figuras	XIII
Índice de tabelas	XV
Índice de gráficos	XVI
Índice de siglas e abreviaturas	XVII
Resumo.....	XIX
Abstract	XX
Capítulo I – Introdução geral.....	1
1.1. Estruturação da dissertação da tese	1
1.2. Introdução	1
1.3. Objetivos do estudo	6
1.4. Justificação do estudo	7
1.5. Metodologia utilizada	7
Capítulo II – Hormonas estrogénicas	8
2.1. Sistema endócrino.....	8
2.1.1 – Composição química das hormonas.....	11
2.2– Caracterização dos estrogénios.....	12
2.2.1 – Características físicas e químicas dos estrogénios	14
2.2.2– Biossíntese dos estrogénios	18
2.2.2.1 – Estrogénios sintéticos.....	21
2.2.3 – Ações fisiológicas e farmacológicas.....	22
2.2.4 – Efeitos metabólicos dos estrogénios.....	23
2.2.5 – Excreção de estrogénios nos homens e mulheres	24
Capítulo III – Metodologias analíticas: desenvolvimento e aplicação	25

3.1 – Introdução	25
3.2. Espectroscopia UV-Visível	27
3.2.1. Introdução	27
3.2.2. Condições experimentais	29
3.2.3. Resultados e discussão	30
3.3 – Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)	31
3.3.1 – Introdução	31
3.3.2 – Condições experimentais	33
3.3.2.1 – Instrumentação	33
3.3.2.2-Reagentes.....	34
3.3.2.2 – Desenvolvimento e adaptação das condições de análise por HPLC	34
3.3.4 – Resultados e discussão	35
3.4 – Electroforese Capilar (EC).....	36
3.4.1 – Introdução	36
3.4.2 – Condições experimentais	38
3.4.2.1. Instrumentação	38
3.4.3 – Desenvolvimento da metodologia analítica por EC	39
3.4.3.1 – Tampão, soluções-padrão, amostras para análise	39
3.4.3.1 – Condições de separação.....	39
3.4.3.2. Eficiência do método.....	40
3.4.4 – Resultados e discussão	41
3.5 – Método radioimunoensaio.....	42
3.5.1 – Introdução	42
3.5.2 – Condições experimentais	43
3.5.2.1. Instrumentação	43
3.5.2.2. Reagentes.....	43

3.5.2.3. Amostras para análise	44
3.5.3 – Metodologia analítica com base em radioimunoensaio	44
3.5.4 – Resultados e discussão	46
3.6– Extração em Fase Sólida	47
3.6.1 – Introdução	47
3.6.2 – Condições experimentais	49
3.6.3 – Condições operacionais: desenvolvimento da metodologia de SPE	51
3.6.3.1. Recuperação dos estrogénios utilizando os procedimentos de SPE testados	51
3.6.3.2 Otimização do processo de SPE escolhido	52
3.6.4 – Resultados e discussão	53
Capítulo IV – Determinação dos estrogénios alvo em afluentes e efluentes das ETARS	54
4.1- Estações de Tratamento de Águas Residuais	54
4.1.1 – Caracterização das Estações de Tratamento de Águas Residuais	54
4.1.2 – Tipos de tratamento das Estações de Tratamento de Águas Residuais	56
4.1.2.1 – Tratamento primário	56
4.1.2.2 – Tratamento secundário	56
4.1.2.3 – Tratamento terciário	58
4.1.2.4 – Outros tratamentos	58
4.1.3 – Descrição das Estações de Tratamento de Águas Residuais em estudo	59
4.1.4 – Os estrogénios no ambiente aquático	59
4.2- Determinação dos estrogénios alvo nas ETARS estudadas	66
4.2.1 – Procedimento experimental	66
4.2.2 – Preparação das amostras recolhidas nas ETARs	66
4.2.3 – Análise das amostras à entrada e saída das ETARs	67
4.2.4 – Resultados e discussão	69
4.3 – Conclusão	72

Capítulo V – Estudo da degradação dos estrogénios	74
5.1 – Introdução	74
5.2 – Procedimento experimental.....	75
5.2.1. Instrumentação	75
5.2.2. Preparação das amostras para medição UV e análise por electroforese capilar	75
5.3 – Resultados e discussão	75
5.3.1 – Análise da degradação por espectroscopia UV-Visível	75
5.3.2 Análise da degradação por electroforese capilar de zona	78
5.3.2.1 - Estudo da degradação.....	78
5.4 – Conclusão	80
Capítulo VI – Uso de Radioimunoensaio na determinação de estrogénios em anfíbios nos efluentes das ETARS.....	81
6 – Introdução	81
6.1. Procedimento experimental	84
6.1.1 – Metodologia Analítica	84
6.1.2– Plano de amostragem	84
6.1.3– Locais de amostragem.....	84
6.1.4.– Amostragem	85
6.1.5. Preparação das amostras	87
6.2. Resultados e discussão.....	88
6.2.1. Quantificação dos estrogénios nas amostras de soro	88
6.2.2. Tratamento dos dados	90
6.3 – Conclusão	92
Capítulo VII – Considerações finais	94
Bibliografia	101

Índice de figuras

Figura 1- Níveis de hidrofiliidade e hidrofobicidade de alguns fármacos	2
Figura 2 – Possíveis percursos dos estrogénios no meio ambiente.....	5
Figura 3 - Ação das hormonas e neurotransmissores.....	9
Figura 4 - O sistema endócrino. Representação de todas as glândulas endócrinas que produzem hormonas no corpo humano.....	10
Figura 5 - Representação esquemática da cascata de sinalização no sistema endócrino	11
Figura 6 - Percursos hormonais. Representações das fontes das principais hormonas, representando cada tipo químico	12
Figura 7 - Vias de síntese das principais classes de hormonas esteroides.....	13
Figura 8 - Biossíntese dos estrogénios	20
Figura 9 – Espectro eletromagnético e o espectro Uv-Visível	28
Figura 10 – Representação de um espectrofotómetro de feixe duplo	28
Figura 11 – Espectrofotómetro de feixe duplo utilizado neste estudo.....	29
Figura 12 - Espectro de absorção dos estrogénios, E1, E2 ,E3 e EE2 com dois máximos de absorção	30
Figura 13- Representação de um Sistema Cromatográfico HPLC	32
Figura 14 - Sistema HPLC utilizado no estudo.....	33
Figura 15- Cromatograma de uma solução-padrão dos estrogénios a uma concentração de 50 mg L ⁻¹	35
Figura 16- Representação esquemática de um Sistema de Electroforese Capilar	37
Figura 17 – Equipamento de electroforese capilar utilizado no estudo, Beckman P/ACE MDQ.....	38
Figura 18 - Electroferograma de uma solução-padrão dos estrogénios a uma concentração de 50 mg L ⁻¹ dos compostos alvo. (E3)-estriol; (E2)-estradiol; (EE2)-etinilestradiol, (E1)-estrone.....	40
Figura 19 - Esquema ilustrativo do funcionamento do método radioimunoenzimático	42

Figura 20 – Representação esquemática do processo de extração em fase sólida – utilizando uma fase reversa	49
Figura 21- Sistema de vácuo utilizado na extração em fase sólida dos compostos alvo	50
Figura 22- Exemplos de Estações de Tratamento de Águas Residuais	55
Figura 23 – Valores da irradiância média de cada mês durante o estudo experimental.....	76
Figura 24 - Sobreposição dos espectros, de cada estrogénio, sobre condições de radiação solar directa	77
Figura 25 –Electroferograma da amostra ao tempo zero (a); depois de 126 dias sob efeito direto da radiação solar (b). Identificação de cada pico: (1) - E3 ; (2)- E2 ; (3) -EE2 (4) E1 – Estrona; - picos não identificados (subprodutos?).....	78
Figura 26 – Variação da concentração(%) de cada estrogénio, em função do tempo.	79
Figura 27 - Captura das rãs <i>Rana/Pelophylax perezi</i> e sua imobilização	86
Figura 28 - Colheita de material biológico (sangue) das rãs <i>Rana/Pelophylax perezi</i>	87

Índice de tabelas

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas e estrutura química da estrona.....	15
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas e estrutura química do estradiol.....	16
Tabela 3 - Propriedades físico-químicas e estrutura química do estriol.....	17
Tabela 4 - Propriedades físico-químicas e estrutura química do etilnilestradiol.....	18
Tabela 5 – Métodos frequentemente utilizados na deteção de estrogénios em amostras de ambientes aquáticos.....	26
Tabela 7- Tempos de migração de cada composto, sob condições otimizadas e com um intervalo de confiança de 95% (n=6).....	41
Tabela 8- Equações da reta e respetivos coeficientes de correlação dos estrogénios em estudo..	41
Tabela 9 – Parâmetros dos padrões do estradiol.....	45
Tabela 10- Parâmetros dos padrões da estrona.....	46
Tabela 11- Descrição dos procedimentos de SPE testados, para uma concentração de 20,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada estrogénio.....	51
Tabela 12- Resumo dos valores das taxas de recuperação dos estrogénios alvo, após SPE e com uma concentração de 20.00 $\mu\text{g L}^{-1}$ (n=3).....	52
Tabela 13 - Taxas de recuperação dos estrogénios alvo a diferentes concentrações (n=3), após Extração em Fase Sólida.....	53
Tabela 14 – Valores das concentrações dos estrogénios alvo, expressas em $\mu\text{g L}^{-1}$ (n=3), à entrada e saída das nove ETARS estudadas (entre 3000 e 6000 habitantes).....	68
Tabela 15— Valores das concentrações dos estrogénios alvo, expressas em $\mu\text{g L}^{-1}$ (n=3), à entrada e saída das nove ETARS estudadas (entre 20 500 e 203 202 habitantes).....	68
Tabela 16 - Caraterização e resultados das concentrações de estrogénios nos indivíduos rã-verde <i>Rana/Pelophylax perezi</i>	88
Tabela 17 – Comparação entre os pares de grupos e o grupo de controle I.....	90
Tabela 18 - Comparação entre os pares de grupos e o grupo de controle II.....	91

Índice de gráficos

Gráfico 1 - Curva de calibração da estrona	46
Gráfico 2 - Curva de calibração do estradiol	47
Gráfico 3 - Gráficos da estrona vs entradas e saídas das diferentes ETARs estudadas (n=3).....	70
Gráfico 4 - Gráficos do estradiol vs entradas e saídas das diferentes ETARs estudadas (n=3).....	70
Gráfico 7 - Concentrações de estrona nos indivíduos rã-verde <i>Rana/Pelophylax perezii</i>	89
Gráfico 8 - Concentrações de estradiol nos indivíduos rã-verde <i>Rana/Pelophylax perezii</i>	89
Gráfico 9- Comparação entre os pares de grupos experimentais e o nº de habitantes que são servidos pelos efluentes das ETARS (rios).....	92

Índice de siglas e abreviaturas

Abs – Absorvância

AMP- adenosina monofosfato

ATP- adenosina trifosfato

b- Percurso ótico

c- Concentração

cpm – contagem por minuto

CZE – eletroforese capilar de zona

DE – Disruptores endócrinos

ϵ - Absortividade molar

E1 – Estrona

E2 – Estradiol

E3 – Estriol

EC- electroforese capilar

ECD's – Endocrine compounds disruptors

EE2 – Etinilestradiol

EM - espectroscopia de massa

EOF – Fluxo eletrosmótico

Er α - recetor α

Er β - recetor β

ESTESC – Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

ETARS – Estações de Tratamento de Águas Residuais

ETAs - Estações de Tratamento de Águas

H.U.C. – Hospitais da Universidade de Coimbra

I.C.N.B. - Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade

Lin - linearidade

LOD – limite de deteção

MS – mass spectroscopy

NADPH- nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

PEG – polietilenoglicol

r^2 - fator de correlação

RSD – desvio- padrão relativo

SE- sistema endócrino

SNC – sistema nervoso central

SPE – solid phase extration/extração em fase sólida

T3- triiodotironina

T4 - tiroxina

TRH- tirotropina

UV – ultravioleta

UV- Vis- ultravioleta - visível

VTG- vitelogenina

λ – comprimento de onda (nm)

Resumo

Os estrogénios naturais e sintéticos quando presentes nos efluentes das Estações de Tratamento de Águas Residuais, podem causar efeitos adversos na saúde humana e animal. Assim, a sua determinação é fundamental para a avaliação de riscos sobre os efeitos de disrupção endócrina no ambiente, constituindo uma preocupante questão de saúde pública. O primeiro objetivo deste estudo foi o desenvolvimento/otimização de vários métodos analíticos para a quantificação simultânea de estrona, 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol e estriol em amostras de águas recolhidas à entrada e saída de nove Estações de Tratamento de Águas Residuais localizadas na região Centro de Portugal.

O segundo objetivo deste estudo foi avaliar a degradação dos quatro estrogénios, sob diversas condições, tais como ao abrigo da luz a diferentes temperaturas e, sob radiação solar direta natural. A cinética da degradação de cada estrogénio foi também estudada nas condições acima referidas, dando-nos uma melhor compreensão do comportamento da degradação dos estrogénios lançadas no meio ambiente, sua persistência e possível acumulação.

O último objetivo deste trabalho consistiu na determinação da concentração de estrogénios em anfíbios (*Rana/Pelophylax perezi*) (machos) em quatro rios junto de estações de tratamento de esgotos e em dois grupos de controlo de águas não contaminadas. Assim, podendo contribuir com informação útil para a conservação destas espécies de vertebrados bem como para a avaliação de riscos decorrente da exposição a estes compostos.

Palavras-chave: estrogénios; análise de águas; estações de tratamento de águas residuais; anfíbios; extração em fase sólida; cromatografia líquida de alta eficiência; espectroscopia UV-Visível; eletroforese capilar; radioimunoensaio.

Abstract

Natural and synthetic estrogens when present in the effluents of Waste Water Treatment Plants can cause adverse effects on human and animal health. Thus, its determination is crucial for risk assessment on the effects of endocrine disruption in the environment, as a public health issue. The first objective of this study was development/optimize some analytical methods for the simultaneous measurement of estrone, estradiol-17 β , 17 α -ethinylestradiol and estriol in water samples collected input and output of nine WWTPs located in in Portugal Central Region.

The second objective of this study was to evaluate the degradation of the four estrogens, under diverse conditions, different temperatures in the dark and under direct solar radiation. The kinetics of degradation of each estrogen was also calculated in studied conditions, giving a better understanding of the degradation behavior of estrogen released into the environment, their persistence and probably accumulation.

The last objective was to investigate the concentrations of estrone and 17 β -estradiol in *Rana/Pelophylax perezi* on four rivers downstream output's WWTPs, located in Portugal Central Region, comparing to two control groups living in a non-contaminated water environment So, we want contribute with useful information for conservation of these species of vertebrates as well as for the assessment of risks arising from exposure to these compounds.

Keywords: estrogens, water analysis, wastewater treatment plant, amphibians, solid phase extraction, high performance liquid chromatography, UV-Visible spectroscopy, capillary electrophoresis, radioimmunoassay.

Capítulo I – Introdução geral

1.1. Estruturação da dissertação da tese

Esta tese encontra-se dividida em sete capítulos: o presente capítulo: introdução geral; capítulo II: hormonas estrogénicas; capítulo III: metodologias analíticas utilizadas e sua otimização; capítulo IV: determinação dos estrogénios alvo em afluentes e efluentes das Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs); capítulo V: estudo da degradação dos estrogénios alvo; capítulo VI: uso de radioimunoensaio (RIA) para determinação de estrogénios em anfíbios presentes nos efluentes das ETARs e capítulo VII: considerações finais.

1.2. Introdução

Atualmente, um dos estudos mais relevantes e expressivos no âmbito da saúde pública, centra-se na presença de micropoluentes no meio ambiente, em concentrações bastante preocupantes. Alguns destes compostos podem produzir efeitos tóxicos na saúde humana e animal, devido à sua presença em águas superficiais e subterrâneas, mesmo em concentrações muito baixas (na ordem dos ng L^{-1}).

Fármacos, disruptores endócrinos (DE) e poluentes orgânicos persistentes, têm sido dos compostos mais pesquisadas devido aos seus efeitos nocivos a vários níveis. Os disruptores endócrinos, são suspeitos de causarem efeitos adversos no sistema endócrino de humanos e

animais. No caso dos fármacos, o efeito mais discutido é o desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos, e no caso dos poluentes orgânicos persistentes, a sua resistência à biodegradação e persistência no meio ambiente causando fenómenos de biomagnificação na cadeia alimentar (Bila *et al.*, 2007; Campani, 2010).

Uma característica importante para o estudo destes compostos é a sua hidrofiliicidade e hidrofobicidade (Fig. 1), já que esta regula os processos de absorção e distribuição de fármacos, sendo necessário que se dissolvam e atravessem as membranas biológicas até alcançarem os respetivos locais de ação (Fatta *et al.*, 2007).

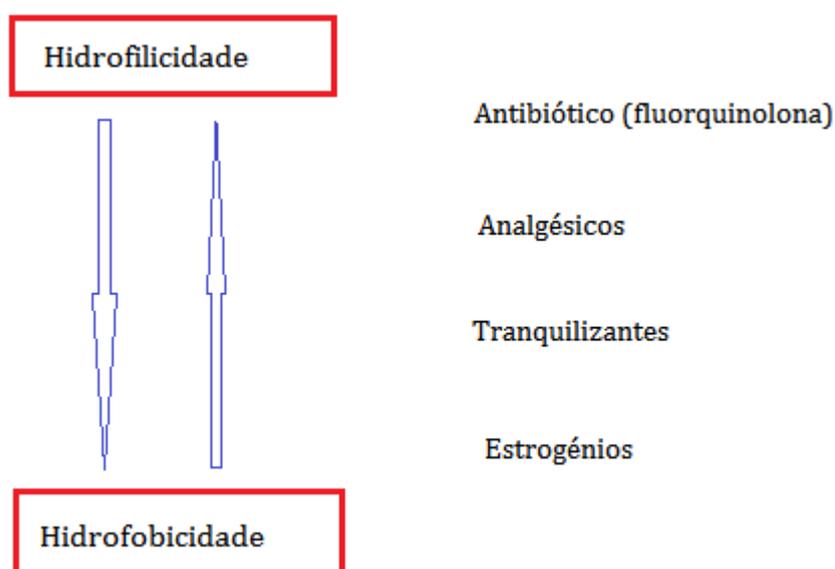


Figura 1- Níveis de hidrofiliicidade e hidrofobicidade de alguns fármacos
(adaptado de Fatta *et al.*, 2007)

De entre estas classes de compostos, a mais preocupante tem sido ligada aos DE, já que a literatura descreve efeitos na reprodução de peixes e outros animais, indução de características femininas em peixes machos, redução da quantidade de esperma e aumento da incidência de alguns tipos de cancro no Homem.

Doenças como cancro da mama, útero e próstata, desenvolvimento sexual anormal, redução de fertilidade masculina, aumento da incidência de ovários policísticos, alteração de glândulas (tíróide), distúrbios na função dos ovários (crescimento folicular e ovulação), fecundação e

consequentemente gravidez, entre o aumento de outras doenças, que ainda não se encontram devidamente sustentadas por estudos (Coleman *et al.*, 2005).

Dentro deste conjunto de efeitos adversos, a disrupção endócrina influencia o desenvolvimento, crescimento, reprodução e mesmo o comportamento dos humanos e animais. Os DE podem danificar e alterar diretamente um órgão endócrino, interagir com um recetor de hormonas e/ou alterar o metabolismo de hormonas no sistema endócrino (Bila *et al.*, 2007; Campani, 2010).

As substâncias que possuem capacidade de afetar o sistema endócrino nos humanos e animais, quando expostos a estas, são várias, nomeadamente compostos sintéticos como o 17 α -etinilestradiol (EE2), pesticidas, bisfenol A, entre outros, e compostos naturais como a estrona (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3) e fitoestrogénios.

Os estrogénios, principalmente o E2 e EE2, têm sido classificados como sendo os maiores responsáveis pela disrupção endócrina, já que possuem um alto potencial estrogénico, sendo excretados diariamente por humanos e animais.

As hormonas esteróides são um grupo de compostos biologicamente ativos, sintetizados a partir do colesterol e que apresentam em comum um anel ciclopentano-o-perhidrofenantereno. Os esteróides naturais são excretados pelo córtex adrenal, testículos, ovários e placenta nos humanos e nos animais e inclui progestogénios, glucocorticóides, mineralocorticóides, androgénios e estrogénios.

Os estrogénios naturais são, predominantemente, hormonas femininas e vitais para a manutenção da homeostase dos tecidos reprodutivos, seios, pele e cérebro. Os estrogénios sintéticos, como o EE2, são utilizados como contraceptivos, aplicados em terapia de reposição hormonal, bem como em doenças hormonais (Ying *et al.*, 2002; Wise *et al.*, 2011).

Nos humanos e nos mamíferos, os estrogénios sofrem várias transformações, principalmente, a nível hepático. São, frequentemente, oxidados, hidrolisados e metilados antes da conjugação final com ácido glucorónico ou sulfato. Por exemplo, o E2 é rapidamente oxidado em estrona que pode ser convertida em estriol, o principal produto de excreção. Muitos outros metabolitos polares, como o 16-hidroxi-estrona, 16-cetoestrona ou 16-epiestriol, são formados a partir do E2 e podem estar presentes na urina e nas fezes.

Os estrogénios são excretados maioritariamente na forma de conjugados polares inativos. O EE2 é eliminado principalmente na forma conjugada, no entanto, outras transformações metabólicas de menor relevância poderão ocorrer. A questão que se levanta é se estes conjugados dos estrogénios naturais e sintéticos, endocrinamente inativos, podem ser convertidos nas formas ativas no meio ambiente ou nas estações de tratamento de águas residuais (ETARs), aumentando a sua concentração ambiental. Esta hipótese é suportada pela deteção de vários estrogénios na forma não conjugada, como o E2, a E1, o 16 α -hidroxiestrone e o EE2, em efluentes de ETARs em concentrações superiores às que seria de esperar com base nas concentrações das formas excretadas (Ying *et al.*, 2002; Ternes *et al.*, 1999; Bila *et al.*, 2007).

Johnson *et al* em 2000 procederam ao levantamento e cálculo da excreção de compostos estrogénicos pelos humanos, estimando a excreção diária de estrogénios para homens e mulheres. A excreção através da urina para os homens foi estimada em cerca de 1.6 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de E2, 3.9 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de E1 e 1.5 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de E3. Para as mulheres menarcas foi calculada uma excreção de 3.5 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de E2, 8 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de E1 e 4.8 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de estriol (E3). Para mulheres na menopausa foi calculada uma excreção de 2.3 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de E2, 4 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de E1 e 1 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de E3; na gravidez foram estimadas excreções de 259 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de E2, 600 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de E1 e 6000 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de E3.

A quantidade excretada de EE2, quando usado como contraceptivo oral pelas mulheres, foi estimada em 35 $\mu\text{g}/\text{dia}$. Baseado nesta excreção diária de estrogénios pelos humanos e no fator de diluição, é esperado existirem no ambiente aquático níveis de estrogénios na ordem dos $\mu\text{g}\text{-ng L}^{-1}$ (Ying *et al.*, 2002).

As hormonas esteróides têm sido detetadas em águas residuais, superficiais, subterrâneas, bem como em solos e alimentos. O comportamento e o destino destas hormonas esteróides no ambiente dependem das suas propriedades físico-químicas e das características do meio ambiente (Fig 2).

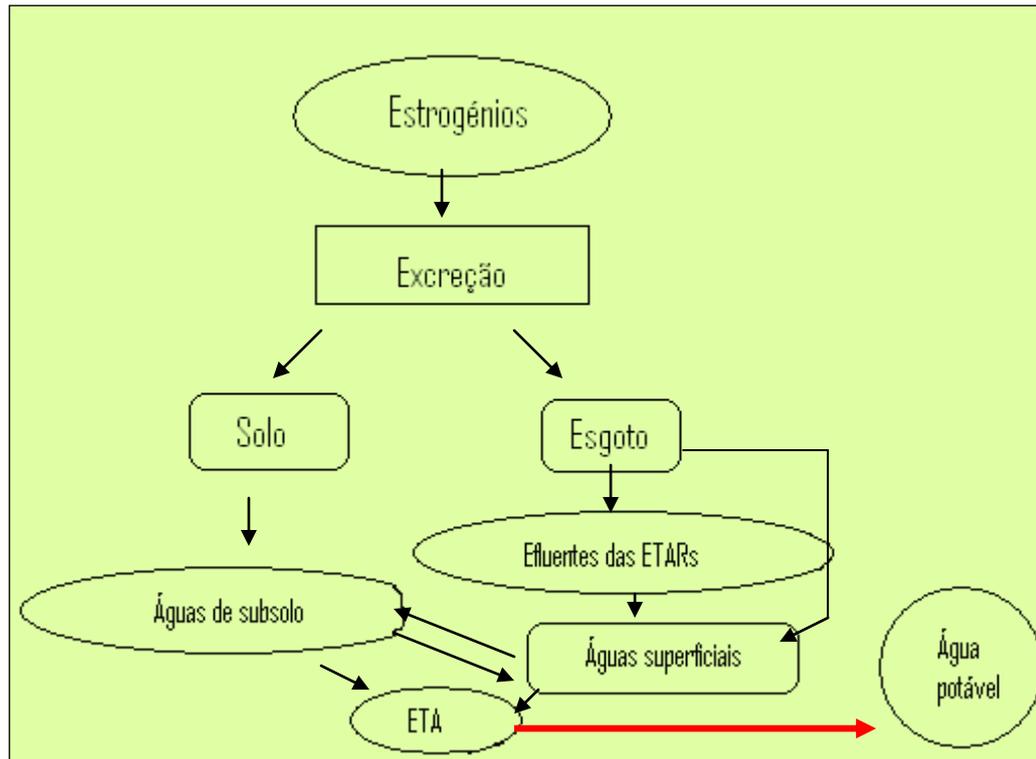


Figura 2 – Possíveis percursos dos estrogénios no meio ambiente
(Fonte própria)

Os estrogénios naturais têm maior solubilidade que os esteróides sintéticos. Estudos indicam que todos eles têm uma adsorção moderada aos sedimentos e baixo tempo de semi-vida nos solos e nas águas, sofrendo ambos uma rápida transformação nas ETARs. A taxa de remoção nas ETARs está dependente da conceção da própria ETAR e da quantidade de dejetos (Ying *et al.*, 2002).

Os efluentes das ETARs são uma complexa mistura de poluentes que poderão apresentar propriedades ou capacidade de provocar disrupção endócrina. A exposição dos seres vivos a estes efluentes, poderá traduzir-se em efeitos negativos a nível individual e, possivelmente, ao nível das populações (Solé *et al.*, 2002).

Assim, a monitorização de estrogénios sintéticos (EE2) e naturais (E1, E2, E3) no meio ambiente tem vindo a ganhar grande interesse, especialmente pelo facto de, frequentemente, serem detetados nas ETARs, águas para consumo humano, rios, lagos, etc., concentrações na ordem dos $\mu\text{g/L}$ e ng/L . A presença destes compostos na água pode causar efeitos adversos na saúde, seja

humana ou de outros organismos presentes nas águas, como os peixes (Ying *et al.*, 2002; Desbrow *et al.*, 1998; Ternes *et al.*, 1999; Solé *et al.*, 2002; Park, *et al.*, 2004).

De entre as hormonas estrogénicas, os estrogénios com maior interesse e habitualmente pesquisados no ambiente aquático são o E1, o E2, o E3 e o EE2, devido ao seu potencial como disruptores endócrinos (Larsson *et al.*, 1999; Örn *et al.*, 2003).

A crescente necessidade em conhecer os potenciais impactos da ação de compostos disruptores endócrinos em seres aquáticos, nomeadamente em peixes, conduziu a uma busca urgente de ensaios fiáveis, para a avaliação do efeito de um determinado composto isoladamente, bem como de misturas complexas, como é o caso dos efluentes domésticos e industriais (Larsson *et al.*, 1999; Örn *et al.*, 2003, Versonnen *et al.*, 2004).

Apesar de ser conhecido o efeito estrogénico de muitos compostos químicos, residem dúvidas sobre se as concentrações em que eles se encontram no meio ambiente são suficientes para causar efeitos fisiológicos adversos nos indivíduos ou populações expostas. Com o intuito de avaliar o risco da exposição, são inúmeros os estudos desenvolvidos nesta área, sendo evidente que a existência de substâncias estrogénicas no meio ambiente é um problema de saúde pública e ambiental global em efluentes de ETARs municipais e hospitalares (Kolpin *et al.*, 2002).

1.3. Objetivos do estudo

De acordo com a pesquisa efetuada, a crescente importância destes estudos na saúde pública e face aos objetivos a seguir descritos, optou-se por estudar três estrogénios naturais, E1, E2, E3 e um estrogénio sintético, o EE2.

No desenvolvimento deste trabalho de investigação pretendeu-se utilizar metodologias, normalmente utilizadas na análise qualitativa e quantitativa, nomeadamente cromatografia líquida de alta resolução com detecção UV, na identificação e quantificação de estrogénios em efluentes com potencial atividade estrogénica, e ainda a quantificação em afluentes de nove ETARS da região central de Portugal, por forma a averiguar a eficiência dos tratamentos de águas residuais. Para tal as amostras recolhidas necessitaram de uma pré-concentração, antes da sua análise, recorrendo-se à técnica de extração em fase sólida, que tem sido apontada também como uma boa técnica de limpeza da amostra.

Pretendeu-se igualmente fazer estudos de termoestabilidade e fotodegradação dos estrogénios alvos, sob condições de controlo de diversos fatores, tais como: temperatura e radiação solar, utilizando também a espectroscopia UV-visível, como forma de comparar e reforçar os resultados obtidos por Eletroforese Capilar.

Segundo a bibliografia consultada, a maior parte dos estudos existentes têm sido realizados principalmente em diversas espécies de peixes, pelo que também faz parte integrante deste trabalho de investigação, a quantificação de estrogénios em anfíbios macho (*Rana/Pelophylax perezi*). Estes animais têm pele permeável, vivem na água e no solo, e devido à sua fisiologia e seu ciclo de vida são expostos a determinadas variações ambientais, sendo particularmente sensíveis à poluição química dos sistemas aquáticos, considerada, hoje em dia, uma das possíveis causas para a crescente extinção destes animais.

1.4. Justificação do estudo

A ocorrência de estrogénios naturais e sintéticos no ambiente aquático pode apresentar efeitos adversos nos humanos, organismos aquáticos e terrestres, já que diversos estudos efetuados têm comprovado a gravidade e a diversidade de problemas que podem advir da exposição a estas substâncias, podendo ser traduzida num problema preocupante de saúde pública e ambiental.

1.5. Metodologia utilizada

A metodologia que foi utilizada neste trabalho de investigação divide-se em duas partes: numa primeira parte em que se efetuou uma pesquisa bibliográfica das técnicas atualmente utilizadas na recolha e preparação das amostras e, numa segunda parte, os métodos analíticos utilizados na determinação dos estrogénios habitualmente presentes em efluentes domésticos ou em sistemas aquáticos. Após esta revisão bibliográfica realizou-se o respetivo desenvolvimento e otimização das metodologias analíticas, incluindo o estudo da influência de diversos fatores, que já foram referidos nos objetivos do trabalho.

Capítulo II – Hormonas estrogénicas

2.1. Sistema endócrino

O sistema endócrino (SE) e sistema nervoso são os principais controladores do fluxo de informação entre as diversas células e tecidos (Fig. 3). O termo “endócrino” denota secreção interna de substâncias com atividade biológica, ao contrário do “exócrino” que denota secreção para fora do corpo, através, por exemplo, das glândulas sudoríparas ou dos ductos que vazam no trato gastrointestinal (Greenspan & Gardner, 2006, 7ª edição). O sistema endócrino usa a secreção interna de hormonas para o interior da circulação para conduzir informação às células alvo, que expressam recetores cognatos. Esse sistema de secreção de hormonas interno é sujeito a complexos mecanismos reguladores que governam a atividade dos recetores, síntese, libertação, transporte e metabolismo para o interior da célula-alvo. O SE também tem relações complexas com o sistema imunológico, a par com o sistema nervoso e, exercendo efeitos disseminados sobre o desenvolvimento, crescimento e metabolismo (Greenspan & Gardner, 2006, 7ª edição; Brunton, Lazo, & Parker, 2006, 11ª edição).

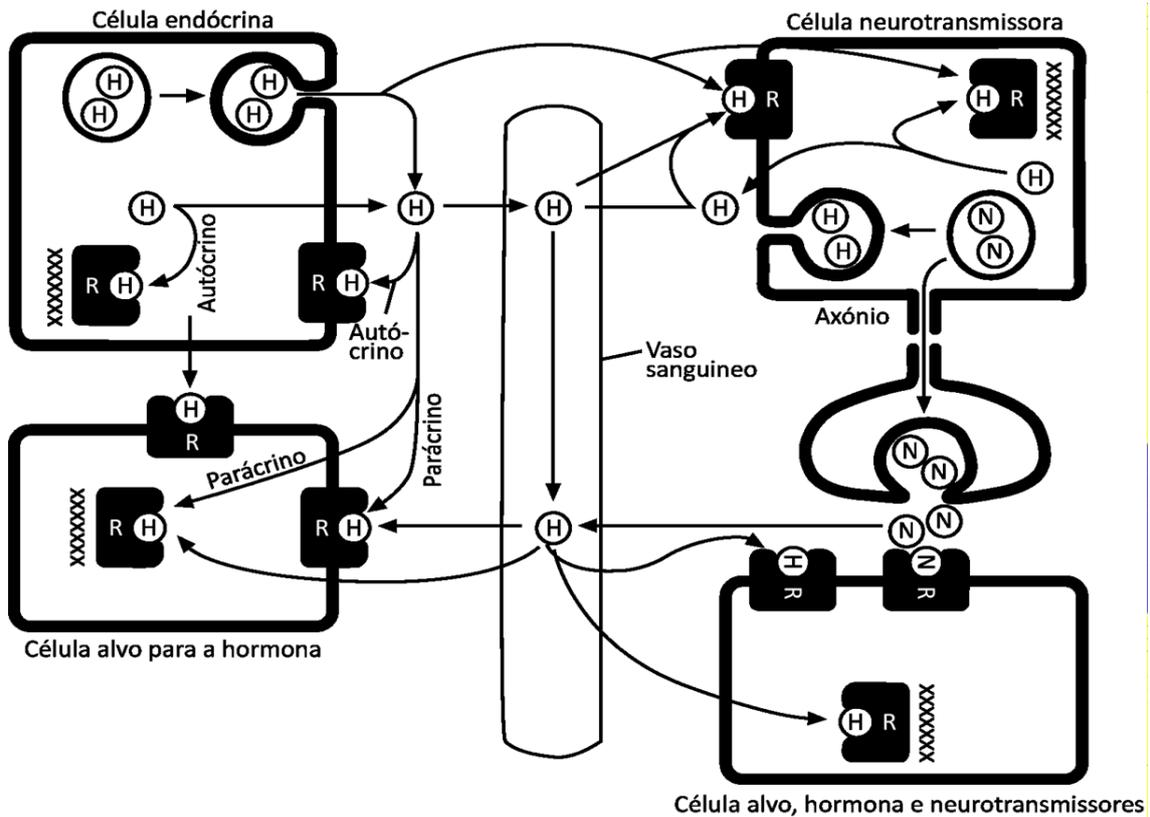


Figura 3 - Ação das hormonas e neurotransmissores.

(Greenspan & Gardner, 2006, 7ª edição)

O sistema endócrino é controlado por produtos químicos conhecidos como hormonas. Essas hormonas são sintetizadas e excretadas pelas glândulas endócrinas, incluindo glândula pineal, hipotálamo, hipófise, tiróide, paratireóide, timo, supra-renais, pâncreas, ovários e testículos (Rehan, 2010) (Fig. 4). Estas glândulas são endócrinas, sendo as hormonas libertadas diretamente na corrente sanguínea, confluindo para os órgãos-alvo (Carter *et al.*, 1996).

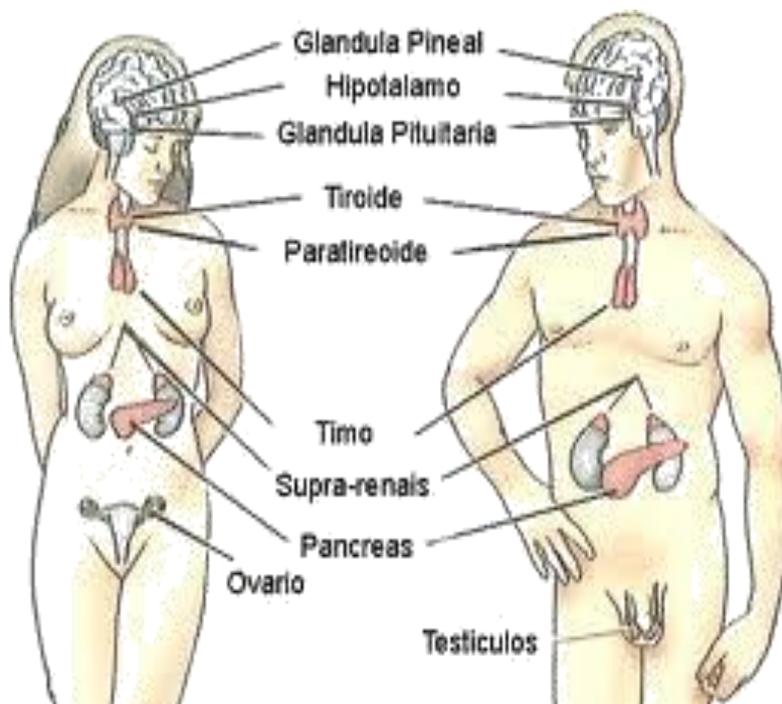


Figura 4 - O sistema endócrino. Representação de todas as glândulas endócrinas que produzem hormonas no corpo humano

(Farabee, 2001)

O SE controla ainda uma série de funções do corpo humano, incluindo o crescimento e desenvolvimento da homeostase, o metabolismo, reprodução e resposta a diversos estímulos (Fig. 5). A diminuição ou o aumento de hormonas ou de recetores pode assim causar vários distúrbios endócrinos.

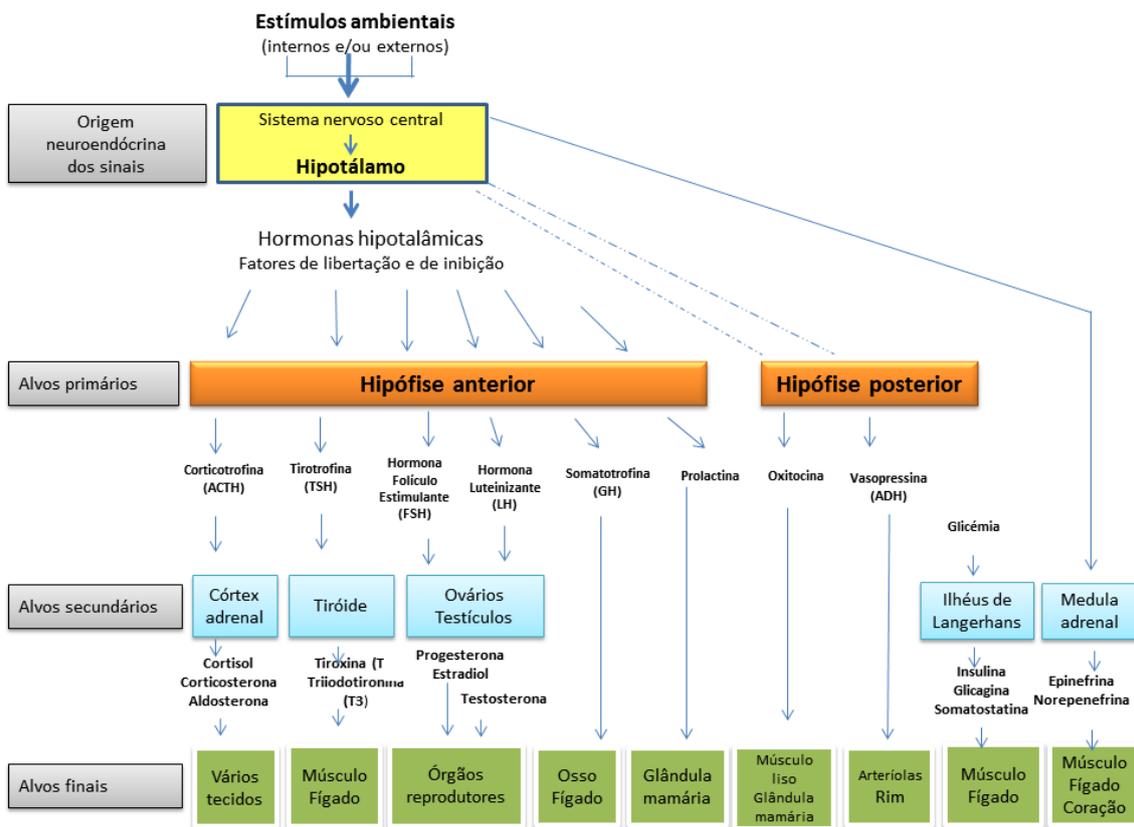


Figura 5 - Representação esquemática da cascata de sinalização no sistema endócrino (Greenspan & Gardner, 2006, 7ª edição)

2.1.1 – Composição química das hormonas

As hormonas podem ser classificadas de acordo com a sua composição química, solubilidade, recetores alvo e respetivos mecanismos de ação. A classificação mais correntemente utilizada é baseada na solubilidade e mecanismo de ação, dividindo-se em dois grupos:

- Grupo 1- contém todas as hormonas lipofílicas que são derivadas do colesterol (com exceção de triiodotironina (T3) e tiroxina (T4)) e que se ligam a recetores intracelulares.
- Grupo 2- contém hormonas solúveis em água que se ligam a recetores na membrana plasmática. (Murray et al., 1996).

As hormonas derivam das principais classes de moléculas biológicas (Fig. 6), podendo ser proteínas (inclusive glicoproteínas), peptídeos ou derivados peptídicos, análogos aos aminoácidos ou lípidos. Hormonas polipeptídicas são produtos diretos da tradução de mRNA específicos, produtos de clivagem de proteínas precursoras maiores ou peptídeos modificados

(Greenspan & Gardner, 2006, 7ª edição). As catecolaminas e as hormonas da tiróide derivam de aminoácidos; as hormonas esteróides e a vitamina D derivam do colesterol; os retinóides derivam dos carotenóides dos alimentos e os eicosanóides derivam dos ácidos gordos.

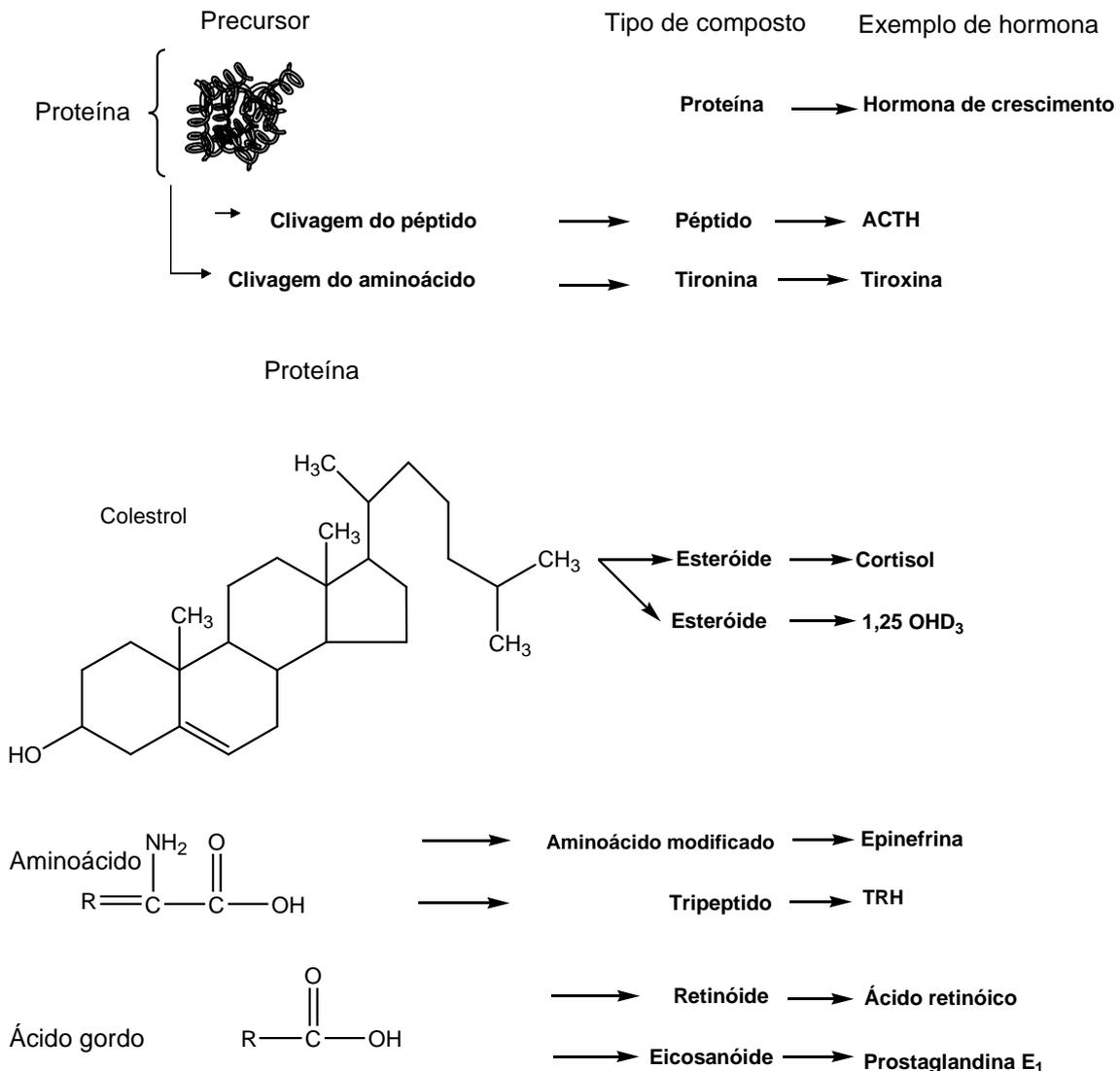


Figura 6 - Precursores hormonais. Representações das fontes das principais hormonas, representando cada tipo químico
(Adaptado de Greenspan & Gardner, 2006, 7ª edição)

2.2- Caracterização dos estrogénios

As hormonas esteróides são sintetizadas principalmente nas suprarrenais, gónadas e placenta. Investigações recentes indicam que os esteróides também podem ser sintetizados no sistema nervoso e noutros tecidos (em menor quantidade). A via geral para a síntese de todas as hormonas esteróides é semelhante (Fig. 7). Diferenças específicas dos tecidos, das células e

até mesmo do compartimento subcelular na expressão das enzimas esteroidogénicas particulares regulam o padrão especial da hormona esteróide sintetizada.

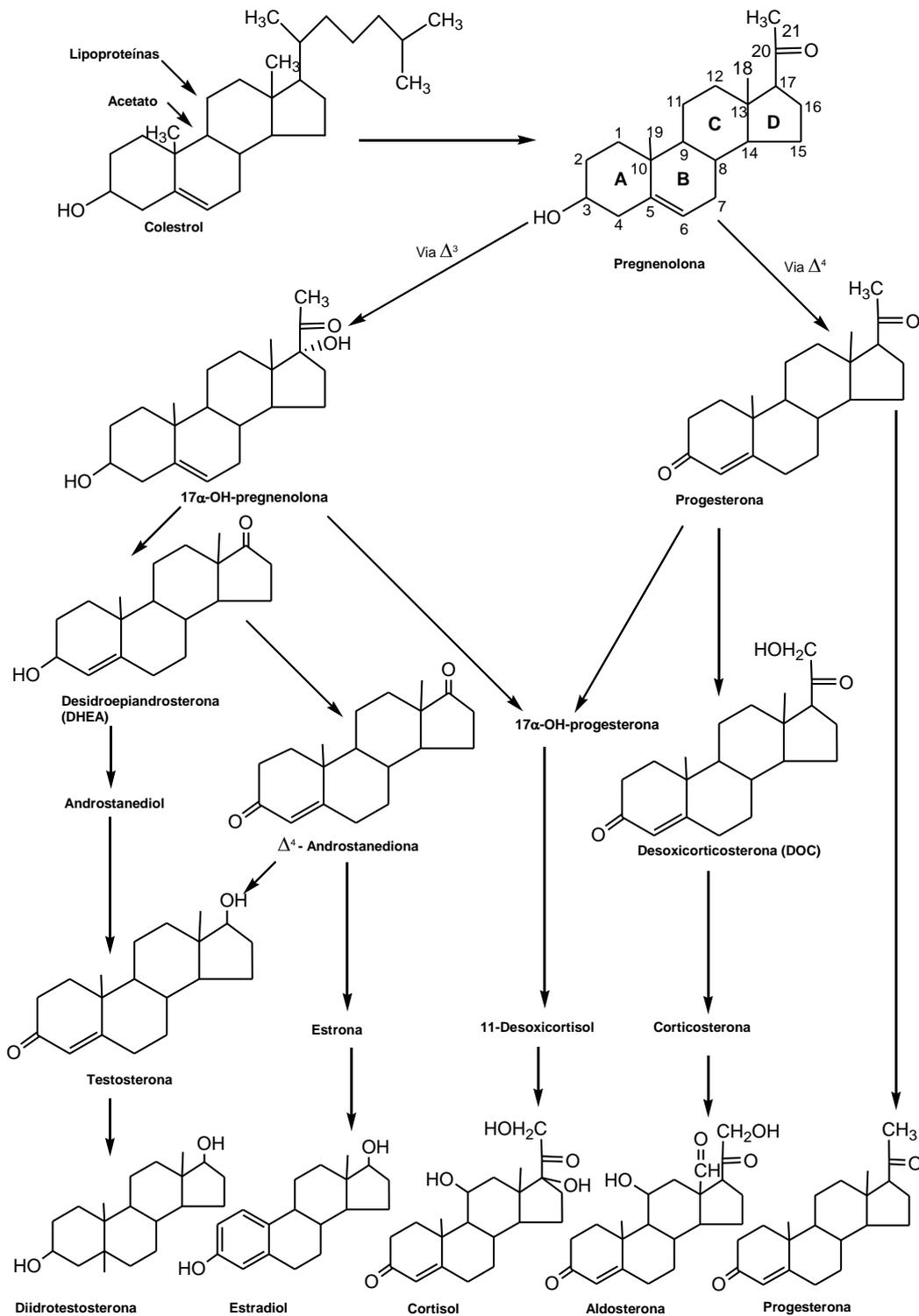


Figura 7 - Vias de síntese das principais classes de hormonas esteróides (Adaptado de Greenspan et al., 2006)

As hormonas estrogénicas são um grupo de compostos biologicamente activos, sintetizados, a partir do colesterol e que apresentam em comum um anel ciclopentano-o-perhidrofenantereno. Os estrogénios naturais são excretados pelo córtex adrenal, testículos, ovários e placenta nos humanos e nos animais e inclui progestogénios, glucocorticóides, mineralocorticóides, androgénios e estrogénios (Ying *et al*, 2002).

Os estrogénios, enquanto hormonas endógenas, são dotados de numerosas ações fisiológicas. Nas mulheres influenciam o desenvolvimento, as interações neuroendócrinas envolvidas no controle da ovulação, no ciclo do aparelho reprodutor para a fertilização e a implantação, bem como aspetos importantes no metabolismo de minerais, hidratos de carbono, proteínas e lípidos. Nos homens, têm também efeitos sobre os ossos, espermatogénese e comportamento.

A biossíntese, transformação e disposição dos estrogénios são bem conhecidas. Há para estas hormonas dois recetores nucleares bem caracterizados, ER α e ER β . Os dois genes para os recetores de estrogénios localizam-se em cromossomas distintos: o *ESR1* codifica o ER α e o *ESR2* codifica o ER β . Ambos os recetores são fatores de transcrição nucleares dependentes dos estrogénios, com diferentes distribuições nos tecidos e efeitos que regulam a transcrição de uma ampla gama de genes-alvo (Brunton, Lazo, & Parker, 2006, 11ª edição).

Nos humanos e nos mamíferos, os estrogénios sofrem várias transformações, principalmente, a nível hepático. São, frequentemente, oxidados, hidrolizados e metilados antes da conjugação final com ácido glucorónico ou sulfato.

2.2.1 – Características físicas e químicas dos estrogénios

Os estrogénios habitualmente pesquisados são: a estrona – 1,3,5(10)-estratrieno-3-ol-17-ona; o 17 β -estradiol – 1,3,5 (10) -estratrieno-3, 17 β -diol; o estriol – 1,3,5(10)-estratrieno-3,16 α ,17 β -triol e o 17 α -etinilestradiol – 17 α -etnil-1,3,5(10)-estratrieno-3,17 β -diol.

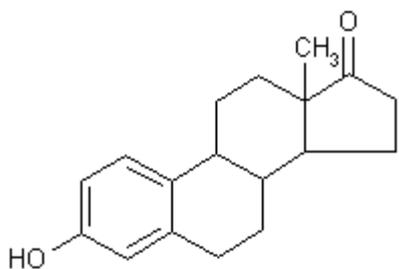
O estrogénio natural mais potente é o 17 β -estradiol, seguido pela estrona e pelo estriol. Cada uma destas moléculas é um esteróide de 18 carbonos contendo um anel fenólico A, com um grupo hidroxilo no carbono 3 e um grupo β -hidroxilo ou cetona na posição 17 do anel D. O anel fenólico A é o principal padrão estrutural responsável pela ligação seletiva, de alta afinidade aos recetores estrogénicos.

A maioria das substituições do anel fenólico A compromete essa ligação, mas a substituição no anel C ou D pode ser tolerada. A substituição do grupo etinil na posição C17 aumenta muito mais a potência oral inibindo o metabolismo hepático de primeira passagem (Brunton, Lazo, & Parker, 2006, 11ª edição).

2.2.1.1 – Propriedades físicas e químicas da estrona

A estrona é um dos três estrogénios naturais, sintetizados a partir da androstenediona. Em mulheres adultas, 50% da concentração total no sangue é produzido pelos ovários. A estrona em crianças, em mulheres na menopausa e homens é principalmente derivada da conversão da androstenediona (Aeron Biotechnology Inc., S.A).

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas e estrutura química da estrona (adaptado de ScienceLab, 2005; Wang et al, 2008)

Formula química	$C_{18}H_{22}O_2$	
Nome químico	1,3,5(10)-estratrieno-3-ol-17-ona	
Nº de CAS	53-16-7	
Massa molar (g/mol)	270.37	
Ponto de ebulição (°C)	255°C	
Solubilidade na água (mg L ⁻¹ a 20°C)	13	
Pressão de vapor (mmHg)	$1,8 \times 10^{-10}$	
pka ^a	10.52	
Log K _{ow} ^b	3.43	

^a constante de acidez; ^b coeficiente de partição octanol-água

2.2.1.2 – Propriedades físicas e químicas do estradiol

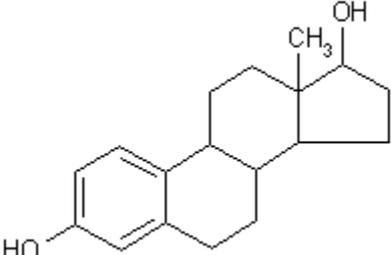
O estradiol, tal como a estrona, é sintetizada a partir de androstenediona, sendo o principal estrogénio humano. Nas mulheres, é responsável pela formação das características femininas, comportamento sexual, crescimento dos órgãos reprodutivos e pela manutenção de oócitos no ovário.

A concentração no sangue pode variar de 0.36 nM durante a fase folicular para 2.8 nM durante o meio do ciclo. Durante a gravidez, a concentração aumenta devido à produção placentária,

subindo o nível para 70 nM. Após a menopausa, a concentração diminui até 0,04 -0.21 nM (Chambliss & Shaul, 2002).

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas e estrutura química do estradiol (adaptado de ScienceLab, 2005; Wang et al, 2008)

Formula química	C ₁₈ H ₂₄ O ₂
Nome químico	1,3,5 (10) -estratrieno-3, 17β-diol
Nº de CAS	50-28-2
Massa molar (g/mol)	272,39
Ponto de ebulição (°C)	173-179 °C
Solubilidade na água (mg L ⁻¹ a 20°C)	13
Pressão de vapor (mmHg)	2,3 x 10 ⁻¹⁰
pka ^a	10,4
Log K _{ow} ^b	3,94



^a constante de acidez; ^b coeficiente de partição octanol-água

É geralmente usado no tratamento dos sintomas da menopausa como terapia de reposição hormonal, devendo, no entanto, ser administrado na menor dose eficaz e pelo mais pequeno tempo possível (Yakabe *et al.*, 2005).

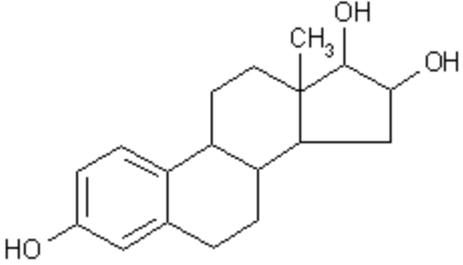
2.2.1.3 – Propriedades físicas e químicas do estriol

O estriol é um metabolito hidroxilado da estrona ou do estradiol (PubChem, SA). É produzido em grandes quantidades durante a gravidez e é responsável por várias funções feto-placentárias.

O E3 é então convertido a partir de 16α-hidroxi derivados pela placenta. Estes derivados são convertidos a partir das pró-hormonas dehidroepiandrosterona e sulfato de dehidroepiandrosterona que são produzidos pela atividade adrenal fetal. O estriol circula na placenta e dirige-se para o fígado materno, onde é conjugado com glucuronídeos e excretado pela urina (Murray *et al*, 1996).

Tabela 3 - Propriedades físico-químicas e estrutura química do estriol
(adaptado de ScienceLab, 2005; Wang et al, 2008)

Formula química	$C_{18}H_{24}O_3$
Nome químico	1,3,5(10)-estratrieno-3,16 α ,17 β -triol
Nº de CAS	50-27-1
Massa molar (g/mol)	288,39
Ponto de ebulição (°C)	282°C
Solubilidade na água (mg L ⁻¹ a 20°C)	13
Pressão de vapor (mmHg)	$6,7 \times 10^{-15}$
pka ^a	10,4
Log K _{ow} ^b	2,81



^a constante de acidez; ^b coeficiente de partição octanol-água

Este estrogénio é geralmente usado no tratamento dos sintomas da menopausa como uma alternativa terapêutica ao estradiol, estrona ou mesmo uma combinação dos dois estrogénios (Kumar et al., 2009).

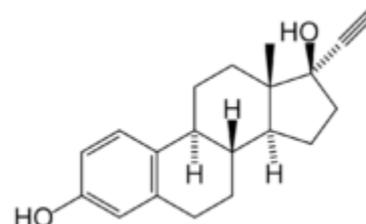
2.2.1.4 – Propriedades físicas e químicas do etinilestradiol

O etinilestradiol é um estrogénio sintético e que tem a mesma ação do estradiol, sendo utilizado como contraceptivo.

É eliminado, principalmente, sob a forma de conjugado, sendo um composto hormonalmente ativo e bastante potente, estando descrito na literatura o impacto que produz no SE de animais (Sumpter & Johnson, 2006).

Tabela 4 - Propriedades físico-químicas e estrutura química do etinilestradiol (adaptado de ScienceLab, 2005; Wang et al, 2008)

Formula química	$C_{20}H_{24}O_2$
Nome químico	17 α -etinil-1,3,5(10)-estratrieno-3,17 β -diol
N ^o de CAS	57-63-6
Massa molar (g/mol)	296,41
Ponto de ebulição (°C)	183°C
Solubilidade na água (mg L ⁻¹ a 20°C)	4,8
Pressão de vapor (mmHg)	$4,5 \times 10^{-11}$
pka ^a	10,5
Log K _{ow} ^b	4,15



^a constante de acidez; ^b coeficiente de partição octanol-água

2.2.2– Biossíntese dos estrogénios

Os estrogénios são sintetizados essencialmente pelo ovário e pela placenta durante a gravidez, sendo os níveis urinários de estriol segregados pela unidade feto-placentar, constituindo um bom indicador da normalidade gravídica. O córtex supra-renal e os testículos também podem produzir estrogénios, embora em menores quantidades (Brunton, Lazo, & Parker, 2006, 11^a edição).

São formados a partir da androstenediona ou testosterona como precursores imediatos. A reação envolve a aromatização do anel A, catalisado em três passos pela aromatase que usa nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase (NADPH) e um oxigénio molecular como co-substrato. No primeiro passo da reação, C19 é hidroxilado.

Uma segunda hidroxilação resulta na eliminação de um grupo hidroximetil C19 recém-formado e, uma hidroxilação final da C2 resultando na formação de um intermediário instável, que se rearranja para formar o anel fenólico A. Toda a reação consome três moléculas de oxigénio e três moléculas de NADPH (Greenspan *et al.*, 2006; Brunton *et al.*, 2006).

A atividade da aromatase situa-se dentro de uma glicoproteína trans-membrana e numa flavoproteína ubíqua, NADPH-citocromo P450 redutase, que também é essencial. Ambas as

proteínas estão localizadas no retículo endoplasmático das células granulosas ovarianas, células de Sertoli e de Leydig testiculares, células estromais do tecido adiposo, sinciotrofoblastos placentários, blastocistos de pré-implantação e em várias regiões cerebrais (Brunton et al., 2006).

Os ovários são a principal fonte de estrogénio circulante nas mulheres antes da menopausa, sendo o estradiol o principal produto secretado, sintetizado pelas células granulosas dos precursores androgénicos proporcionados pelas células de teca.

A atividade da aromatase é induzida pelas gonadotropinas, que agem via recetores da membrana do plasma para elevar as concentrações intracelulares de adenosina 3'-5'-monofosfato (AMP cíclico).

As gonadotrofinas e o AMP cíclico também aumentam a atividade da enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol e facilitam o transporte do colesterol (o precursor dos esteróides) nas mitocôndrias das células que sintetizam os esteróides (Brunton, Lazo, & Parker, 2006, 11ª edição; Greenspan & Gardner, 2006, 7ª edição).

O estradiol secretado é oxidado reversivelmente em estrona pela 17-hidroxiesteróide desidrogenase e ambos os estrogénios podem ser convertidos em estriol (Fig. 8).

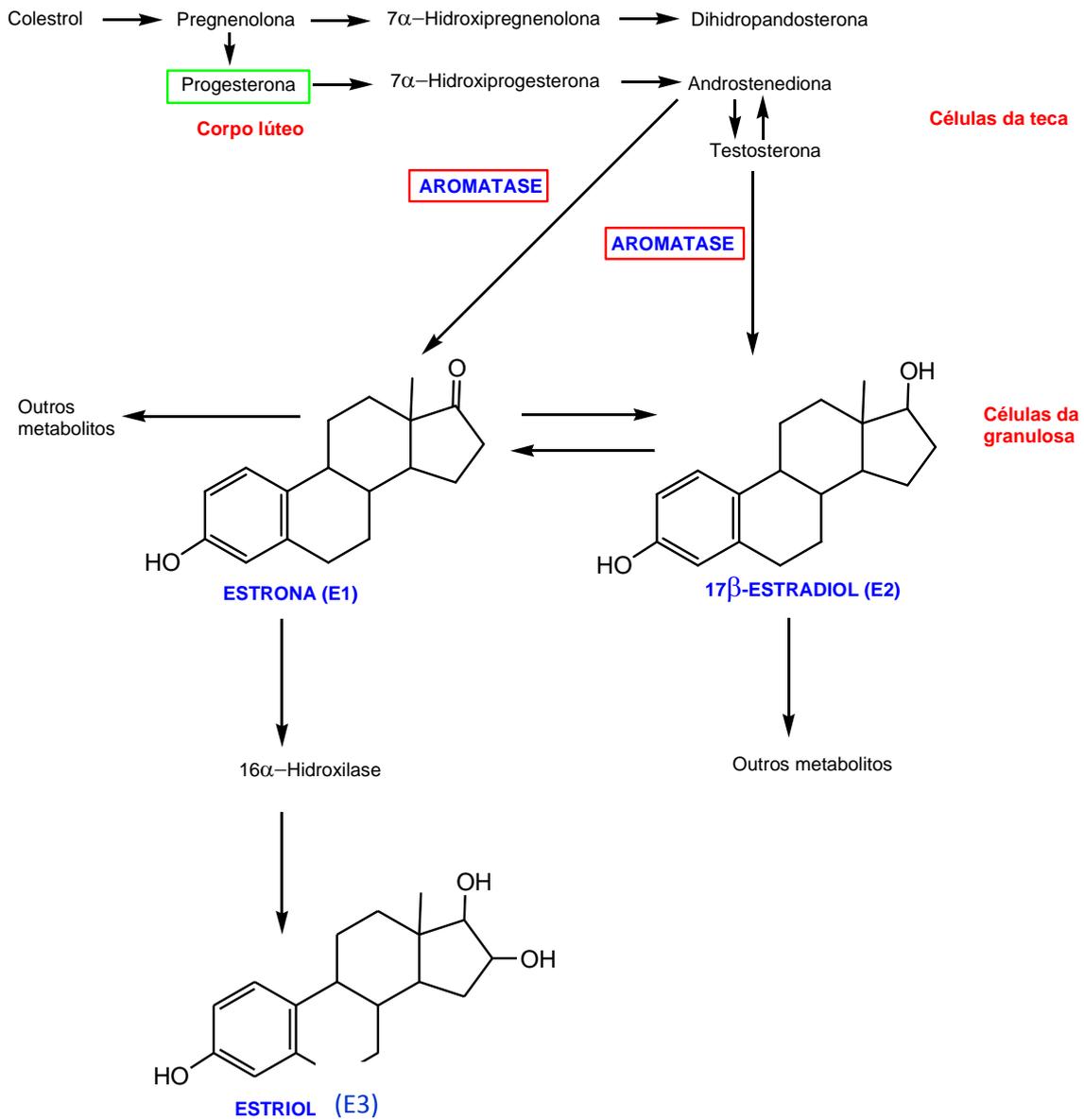


Figura 8 - Biossíntese dos estrogénios
(Adaptado de Greenspan & Gardner, 2006, 7ª edição)

Tais transformações são observadas principalmente no fígado. Os três estrogénios são excretados na urina juntamente com os glicoronídeos e os sulfatos conjugados.

Nos homens e nas mulheres (após a menopausa), a principal fonte de estrogénio é o estroma do tecido adiposo onde a estrona é sintetizada a partir da desidroepiandrosterona, secretada pelo córtex adrenal. Portanto, o nível de estrogénios é regulado em parte pela disponibilidade de precursores androgénicos.

Os efeitos estrogénicos frequentemente são atribuídos às hormonas circulantes, mas os estrogénios podem também ser produzidos localmente em algumas circunstâncias. Por exemplo, os estrogénios podem ser produzidos a partir dos androgénios pela ação da aromatase ou dos estrogénios conjugados, por hidrólise.

Tal produção local de estrogénios, poderá exercer um papel causal no desenvolvimento de certas doenças como o cancro da mama, desde que estes tumores mamários, contenham tanto a aromatase como enzimas hidrolíticas. Da mesma forma, os estrogénios podem ser produzidos pelos androgénios, via aromatase, presentes no Sistema Nervoso Central (SNC) e exercem efeitos locais próximos ao local de sua produção.

Grandes quantidades de estrogénios são sintetizados pela placenta, que usa a desidroepiandrosterona fetal e seu derivado 16α -hidroxil para produzir estrona e estradiol, respetivamente, sendo a urina humana durante a gravidez, portanto, uma abundante fonte natural de estrogénios naturais (Gilman & Goodman, 1996, 9ª edição).

Grande parte da estrona e estriol são formados no fígado por metabolização do estradiol, ou nos tecidos periféricos a partir da androsteronodiona e outros androgénios (Greenspan & Gardner, 2006, 7ª edição).

2.2.2.1 – Estrogénios sintéticos

Os estrogénios naturais são rapidamente metabolizados pelo fígado, o que reduz a sua atividade quando administrados *per os*. Por manipulações químicas dos estrogénios naturais, obtiveram-se compostos semi-sintéticos com maior resistência hepática, e como tal mais ativos por via oral, salientando-se o etinilestradiol, entre outros (Brunton, Lazo, & Parker, 2006, 11ª edição; Greenspan & Gardner, 2006, 7ª edição).

Há atualmente vários estrogénios disponíveis para administração oral, parenteral e transdérmica, e dado a sua natureza lipofílica, a absorção é geralmente boa na forma galénica mais apropriada.

Existe hoje no mercado, uma grande variedade de anticoncecionais que contêm etinilestradiol, incluídos nos vários tipos de contraceptivos orais, entre eles o método combinado, método

sequencial, método polifásico e minipílula. Encontram-se disponíveis para administração oral, parenteral, transdérmico ou tópico (Brunton, Lazo, & Parker, 2006, 11ª edição).

A administração oral é bastante comum, podendo-se prescrever estradiol, ésteres de estrona, etinilestradiol e outros estrogénios. No entanto, o próprio estradiol não é frequentemente utilizado por via oral, devido ao seu substancial metabolismo hepático.

O etinilestradiol é bastante utilizado por via oral, isoladamente ou com um progestogénio nos anticoncepcionais orais; a substituição etinil na posição C17 inibe o metabolismo hepático de primeira passagem (Brunton, Lazo, & Parker, 2006, 11ª edição).

2.2.3 – Ações fisiológicas e farmacológicas

Os estrogénios são necessários para a harmoniosa maturação feminina. Durante a puberdade, eles estimulam o desenvolvimento do aparelho genital e dos caracteres sexuais secundários, mantendo-os num adequado estado de trofismo na vida adulta. Na menopausa, a queda dos níveis de estrogénios acarreta uma progressiva atrofia do trato genital feminino.

Ao nível do útero, os estrogénios induzem a proliferação das células do endométrio e das fibras lisas. Na puberdade, os estrogénios são igualmente responsáveis pelo desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários: distribuição ginóide do tecido adiposo, crescimento do pelo axilar e púbico, e desenvolvimento da glândula mamária.

Na mulher adulta, os estrogénios diminuem a reabsorção óssea por antagonismo sobre a paratormona, sem contudo, estimularem a formação óssea. Em algumas espécies, os estrogénios influenciam o comportamento sexual, porém, na espécie humana o seu condicionamento é muito mais complexo, embora os estrogénios possam aumentar a libido.

Os estrogénios aumentam a coagulabilidade sanguínea, estando descritas muitas alterações nos fatores reguladores da coagulação, como o aumento dos níveis circulantes dos fatores II, VII, IX, X e do fibrinogénio (I) e diminuição da antitrombina III.

Os estrogénios aumentam ainda a síntese de algumas proteínas transportadoras, tais como a transcortina, tiroxina, globulinas e a transferrina (Brunton, Lazo, & Parker, 2006, 11ª edição).

2.2.4 – Efeitos metabólicos dos estrogénios

Os estrogénios afetam muitos tecidos e possuem várias ações metabólicas em seres humanos e animais, embora estas ações ainda não estejam totalmente claras, ou seja, se resultam diretamente da ação das hormonas nos tecidos em questão, ou se são em outros locais. Muitos tecidos não relacionados com o aparelho reprodutor, nomeadamente os ossos, endotélio vascular, fígado, SNC, sistema imunológico, trato gastrointestinal e coração, expressando baixos níveis dos recetores de estrogénios, e em que a razão entre $Er\alpha$ e $Er\beta$ varia especificamente conforme a célula.

No entanto estes efeitos dos estrogénios podem ser positivos ou menos positivos, a saber:

Efeitos positivos:

- Sobre a massa óssea; regulam diretamente os osteoblastos e aumentam a síntese do colagénio tipo I, osteocalcina, osteopontina, fosfatase alcalina e outros marcadores de diferenciação dos osteoblastos;
- O estrogénio isolado diminui levemente os níveis de glicose e insulina em jejum;
- Em concentrações relativamente altas, têm atividade anti-oxidante;
- Promovem o crescimento de células endoteliais, ao mesmo tempo que inibem a proliferação das células do músculo liso (Brunton, Lazo, & Parker, 2006, 11ª edição).

Efeitos menos positivos:

- Afetam o crescimento ósseo e o fecho das epífises em ambos os sexos;
- Diminuem a produção das citocinas estimulantes dos osteoblastos interleucina (IL)-1, IL-6 e fator de necrose tumoral;
- Aumentam a apoptose dos osteoclastos;
- Elevam geralmente os triglicéridos séricos e reduzem ligeiramente os níveis séricos do colesterol total;
- Alteram a composição da biliar, aumentando a secreção do colesterol e reduzindo a secreção de ácido biliar, parecendo a maior causa na formação de cálculos biliares em mulheres que são tratadas com estrogénios;
- Afetam muitas proteínas séricas, principalmente as envolvidas na ligação de hormonas e nas cascatas de coagulação;

- Alteram algumas vias metabólicas que afetam o sistema cardiovascular;
- Podem aumentar os fatores de coagulação II, VII, IX, X e XII;
- Podem reduzir os fatores de anti-coagulação das proteínas C e S, e antitrombina III (Brunton, Lazo, & Parker, 2006, 11ª edição).

2.2.5 – Excreção de estrogénios nos homens e mulheres

Os estrogénios são excretados principalmente sob a forma biológica inativa e conjugada, não possuindo atividade biológica direta, sendo no entanto, desconjugadas por bactérias fecais antes da entrada nas ETARs (D'Ascenzo *et al.*, 2000; Baronti *et al.*, 2000).

A produção de estrogénios nos homens e mulheres varia em função de vários fatores, nomeadamente o género, idade e ciclo reprodutivo. A estrona, estradiol e estriol são hormonas femininas, em que, fisiologicamente a mulher produz e excreta naturalmente mais estrogénios que o homem, sendo esta produção mais abundante durante o período fértil e menos abundante na menopausa. De salientar, que os estrogénios sintéticos são mais estáveis, permanecendo no corpo humano por mais tempo, comparativamente aos estrogénios naturais que têm uma vida mais curta e não se acumulam nos tecidos (Tapiero *et al.*, 2002).

Como foi referido no capítulo I, Johnson *et al.* em 2000 procederam ao levantamento e cálculo da excreção de compostos estrogénicos pelos humanos. Na estimativa da excreção diária de estrogénios para homens e mulheres, basearam-se nas seguintes equações matemáticas:

$$E_1 \text{ (ng/L)} = P/114,3 \times F \quad \text{Equação 1}$$

$$E_2 \text{ (ng/L)} = P/262,8 \times F \quad \text{Equação 2}$$

$$E_3 \text{ (ng/L)} = P/23,64 \times F \quad \text{Equação 3}$$

onde:

P = nº de habitantes que são servidos pelas ETARs

F = escoamento médio das águas residuais expresso em $\text{m}^3 \text{ dia}^{-1}/1000$

existindo no entanto alguma incerteza relativamente à estrutura da população e aos valores de excreção diária (Jonhson *et al.*, 2000).

Capítulo III – Metodologias analíticas: desenvolvimento e aplicação

3.1 – Introdução

A análise e monitorização de hormonas estrogénicas e seus compostos sintéticos similares, na água, efluentes domésticos, águas naturais, solos, sedimentos marinhos e lodo/lama biológico, têm constituído um desafio analítico para muitos investigadores, devido não só à complexidade da matriz, a qual poderá apresentar inúmeros interferentes na análise dos compostos alvo, mas também, devido aos baixos limites de deteção necessários para a sua determinação (aproximadamente 1ng L^{-1}).

Alguns destes compostos conseguem exercer efeito sobre o sistema endócrino de determinados seres vivos, mesmo quando presentes no meio aquático em concentrações bastante baixas, ou ainda potenciar a ação de outros poluentes presentes no ambiente. Assim, para a determinação de estrogénios naturais e sintéticos em amostras de água são necessárias técnicas analíticas de elevada precisão, exatidão e sensibilidade, que maioritariamente se tornam bastante complexas e demoradas (Alda & Barceló, 2001).

Diferentes métodos analíticos têm sido citados na literatura, sendo que, os primeiros métodos foram validados para matrizes biológicas, como sangue, urina e tecidos. No entanto, algumas modificações nestes métodos têm sido efetuadas e aplicadas em amostras ambientais como águas residuais, superficiais e subterrâneas, sedimentos, solos e lamas biológicas.

Ternes *et al*, em 2001 efetuou uma revisão bibliográfica dos vários métodos analíticos utilizados na quantificação de vários fármacos e estrogênios, em diferentes matrizes ambientais aquosas. Os métodos predominantes de detecção dos compostos alvo têm sido a cromatografias gasosa (GC) e a líquida (HPLC), quase sempre acoplados à espectroscopia de massa (MS).

Contudo, para aplicação destes métodos, necessariamente tem que se recorrer a técnicas de pré-concentração, sendo a mais comum a extração em fase sólida (SPE), uma técnica relativamente simples, rápida e que requer pouca quantidade de solventes. A preparação da amostra, pode incluir purificação da amostra, concentração e/ou derivatização para posteriormente ser efetuada a respetiva quantificação.

A Tabela 5 apresenta os diferentes métodos utilizados na detecção de estrogênios em amostras ambientais já aplicadas.

Tabela 5 – Métodos frequentemente utilizados na detecção de estrogênios em amostras de ambientes aquáticos em diversos países (Itália, França, Reino Unido, Holanda, Alemanha, Brasil, Canadá)

Método analítico	Estrogénios	Amostra	Referência
HPLC/MS	E1, E2 E3 EE2	Águas naturais, potáveis e efluentes de ETAs	Jonhson <i>et al</i> , 2000 Alda & Barceló, 2001 Laganá <i>et al</i> , 2004
HPLC/MS/MS	E1 E2	Afluente e efluentes de ETARs	Baronti <i>et al</i> , 2000 Xiao, 2001
GC/MS	E1, E2 E3 EE2	Afluente e efluentes de ETAS Águas superficiais	Desbrow & Brighty, 1998 Mol <i>et al</i> , 2000 Ternes <i>et al</i> , 2001 Xiao, 2001 Cargouet <i>et al</i> , 2004
GC/MS/MS	E1, E2 E3 EE2	Águas naturais e efluentes de ETAS Águas subterrâneas	Belfroid <i>et al</i> , 1999 Kelly C. , 2000 Fine <i>et al</i> , 2003

A maioria dos estudos consultados na bibliografia (referenciados na tabela 5) revela dois objetivos principais: por um lado, o desenvolvimento de metodologias apropriadas para a

identificação e quantificação de potenciais agentes disruptores endócrinos à entrada e à saída de estações de tratamento de águas, ou a montante e jusante de locais de descarga de efluentes domésticos em sistemas aquáticos, e por outro lado, o estudo dos efeitos destes agentes sobre os seres vivos a eles expostos.

A literatura também refere o uso de técnicas biológicas na identificação e quantificação de estrogénios naturais e sintéticos tais como os ensaios de imunoadsorção enzimática (ELISA) e radioimunoensaio (RIA), (Skoog, Nieman, & Holler, 5ª edição, 2002), sendo estes baseados no uso de antigénios e anticorpos, e de salientar que têm sido descritos como métodos altamente sensíveis e seletivos para análise de estrogénios e outros disruptores endócrinos em ambientes aquáticos.

Os métodos analíticos que foram escolhidos no desenvolvimento deste trabalho experimental, e de acordo com os objetivos pretendidos, foram a espectroscopia UV-visível, electroforese capilar, cromatografia líquida de alta eficiência com deteção ultravioleta, radioimunoensaio e como método de extração dos compostos alvo em amostras de águas residuais, a extração em fase sólida, que a seguir são descritos.

3.2. Espectroscopia UV-Visível

3.2.1. Introdução

Os métodos espectroscópicos baseiam-se na absorção e/ou emissão de radiação eletromagnética por muitas moléculas, quando os seus eletrões se movimentam entre diferentes níveis energéticos. A espectrofotometria baseia-se, assim, na absorção da radiação nos comprimentos de onda entre a gama do ultravioleta e o infravermelho. A região do visível corresponde aos comprimentos de onda compreendidos entre 390 nm (violeta) e 760 nm (vermelho) (Fig. 9) (Skoog, West, & Holler, 7ª edição, 1995; Skoog, Nieman, & Holler, 5ª edição, 2002).

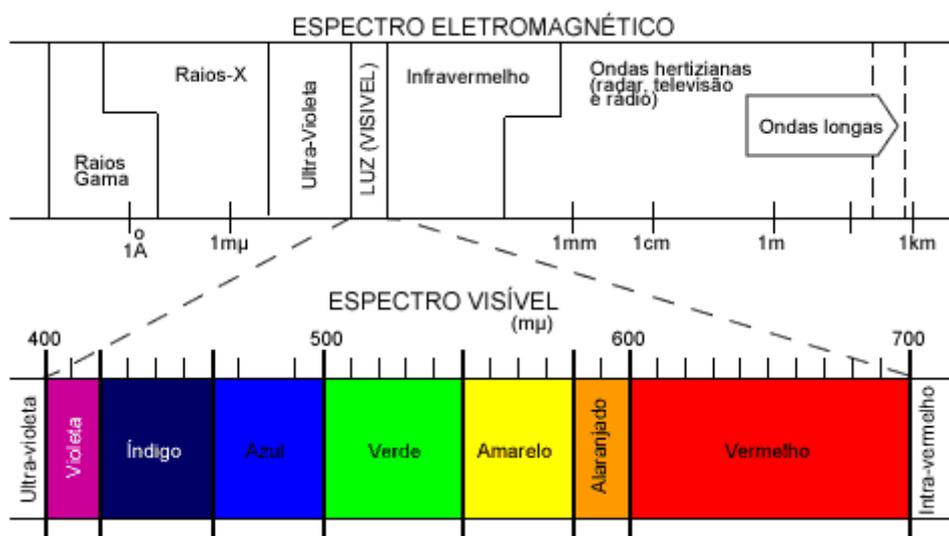


Figura 9 – Espectro eletromagnético e o espectro Uv-Visível

Os espectrofotômetros UV-Vis podem ser de feixe simples ou de feixe duplo, onde um feixe de luz monocromática passa através de uma solução, medindo assim, a quantidade de luz que foi absorvida por essa solução, a determinado comprimento de onda (Fig. 10).

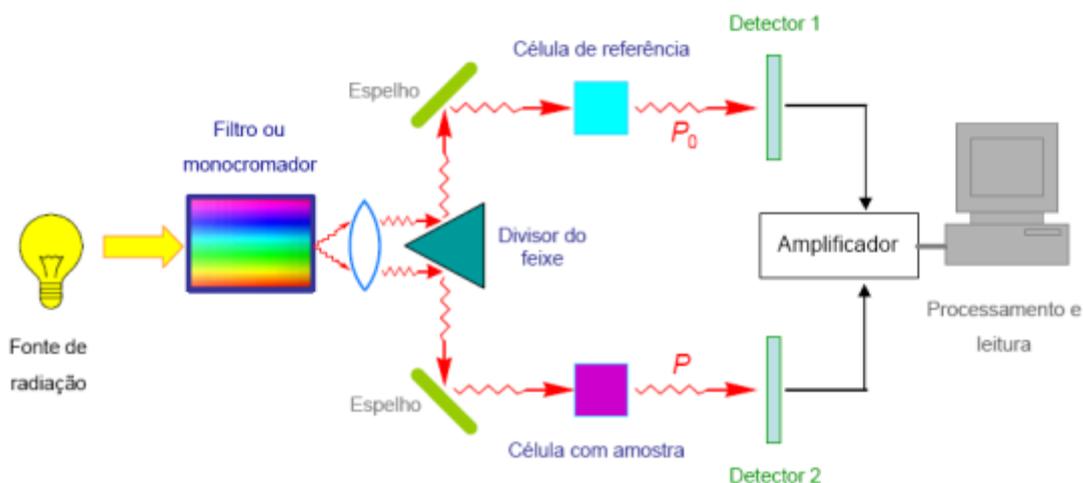


Figura 10 – Representação de um espectrofotômetro de feixe duplo

O método utilizado para determinar de um modo quantitativo a concentração de substâncias em solução que absorvem a radiação, é através da lei de Beer-Lambert (Skoog, Nieman, & Holler, 5ª edição, 2002):

$$A = \epsilon bc$$

Equação 4

Onde: A, é a absorvância; b, o percurso ótico (cm); c, a concentração (mol L^{-1}) e ϵ , a absortividade molar ($\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$).

Esta técnica analítica tem sido bastante utilizada e descrita na literatura em estudos de degradação de fármacos e outros compostos (Tusnelda & Fritz, 2003; Mónica & Scott, 2005; Chiron *et al.*, 2006; Matamoros *et al.*, 2009), revelando alta sensibilidade, ampla faixa de resposta linear e instrumentação simples.

Assim, utilizou-se esta técnica para a análise da degradação das espécies em estudo, sob diversas condições experimentais e ao longo do período de tempo em investigação.

3.2.2. Condições experimentais

3.2.2.1. Instrumentação

Todas as medições UV foram realizadas utilizando um Espectrofotômetro Shimadzu UV-1603 (Fig. 11), células de quartzo com um percurso ótico de 1 cm e velocidade de varrimento lenta.



Figura 11 – Espectrofotômetro de feixe duplo utilizado neste estudo
(Fonte própria: Laboratório (5) de Farmácia da EST_ESC)

3.2.2.2. Preparação das amostras para medição UV

As soluções-padrão de E1, E2, E3 e EE2 foram todas preparadas individualmente, num volume apropriado de metanol e com uma concentração de 2 g L⁻¹. Foram feitas diluições de cada solução stock em água com metanol a 5%, obtendo-se uma concentração final de 0,1 g L⁻¹.

3.2.3. Resultados e discussão

Os espectros de absorção dos quatro estrogénios foram traçados no intervalo de comprimento de onda compreendido entre 210 e 300 nm (Fig. 12). Os espectros são semelhantes na forma, e apresentam duas bandas de absorção com máximos, a 226 nm e a 281 nm.

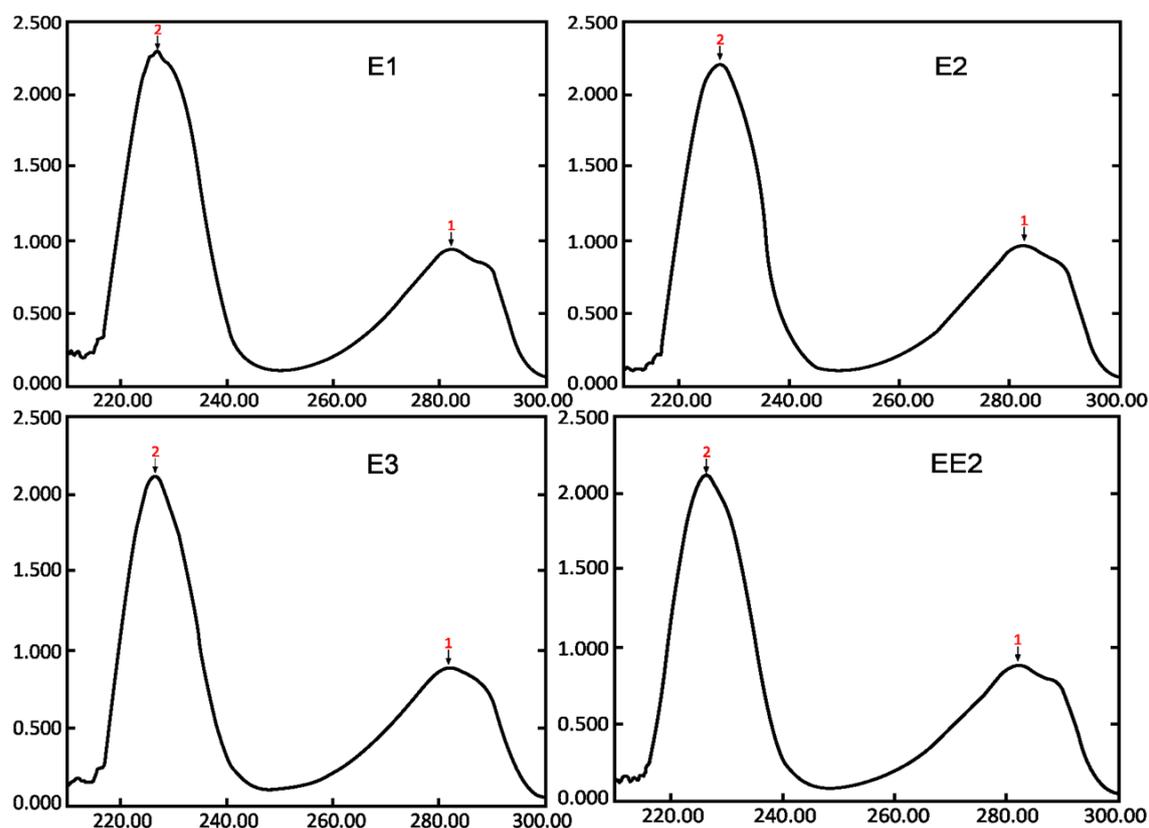


Figura 12 - Espectro de absorção dos estrogénios, E1, E2, E3 e EE2 com dois máximos de absorção
1 (pico 1) - 281 nm; **2** (pico 2) - 226 nm

Após a análise dos espectros de absorção, foi escolhido o comprimento de onda de 281 nm, para a realização do estudo de degradação dos compostos alvo.

Todas as soluções de trabalho, após preparação, foram acondicionadas em frascos de vidro fechados e devidamente guardadas de acordo com as condições experimentais descritas no capítulo V.

3.3 – Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)

3.3.1 – Introdução

A Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC) é uma técnica de separação que nas últimas três décadas, passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos, com aplicabilidade na indústria farmacêutica, determinações ambientais e em muitos outros campos da ciência, como o da medicina.

Atualmente, as razões da utilização desta técnica analítica, prendem-se com a sua adaptabilidade às determinações quantitativas com boa sensibilidade, exatidão, precisão, boa resolução e rapidez, tornando-a numa técnica extremamente versátil e de grande aplicação, sendo ainda uma das grandes vantagens desta técnica, o facto de não depender da vaporização da amostra (Skook , West, & Holler, 1996; Laganá et al., 2004; Fatta et al., 2007).

A cromatografia líquida é um método físico-químico de separação no qual os constituintes da amostra são distribuídos em duas fases, uma estacionária (sólida, líquida ou de fase ligada) e a outra móvel (líquida). Os mecanismos de distribuição dos constituintes a separar podem ser: de adsorção, em que, as separações ocorrem através de interações electroestáticas e forças de Van Der Waals entre a fase estacionária (sólida ou de fase ligada) e a fase móvel líquida; de partição, em que, as separações se baseiam nas diferenças de solubilidade dos componentes na fase estacionária (líquida ou de fase ligada) e na fase móvel (líquida); de troca iónica, em que, as separações se baseiam no equilíbrio de troca iónica entre a fase estacionária (resina de troca iónica) e a fase móvel (líquida); e de exclusão molecular, em que, as separações se fazem com base nas diferenças relativamente do tamanho das moléculas.

O processo de distribuição dos solutos entre as fases, numa coluna analítica, tem vindo a ser utilizado na identificação de compostos através da comparação com padrões previamente

existentes, na purificação de compostos separando-se as substâncias indesejáveis e na separação dos componentes de uma mistura.

As colunas analíticas são maioritariamente de enchimento/empacotamento apresentando um comprimento que pode variar no intervalo entre 5 e 30 cm e o diâmetro interno variar entre 3 e 10 mm. Relativamente à composição da fase estacionária, esta pode ser pelicular ou de partícula porosa (sendo as de sílica mais comuns, variando o tamanho das partículas entre 5 a 10 μm).

A injeção da amostra é efetuada diretamente na fase móvel no topo da coluna através de uma válvula de injeção, conforme figura 13 (Skoog, West, & Holler, Analytical chemistry- an introduction, 7ª edição, 1995; Skoog, West, & Holler, 1996).

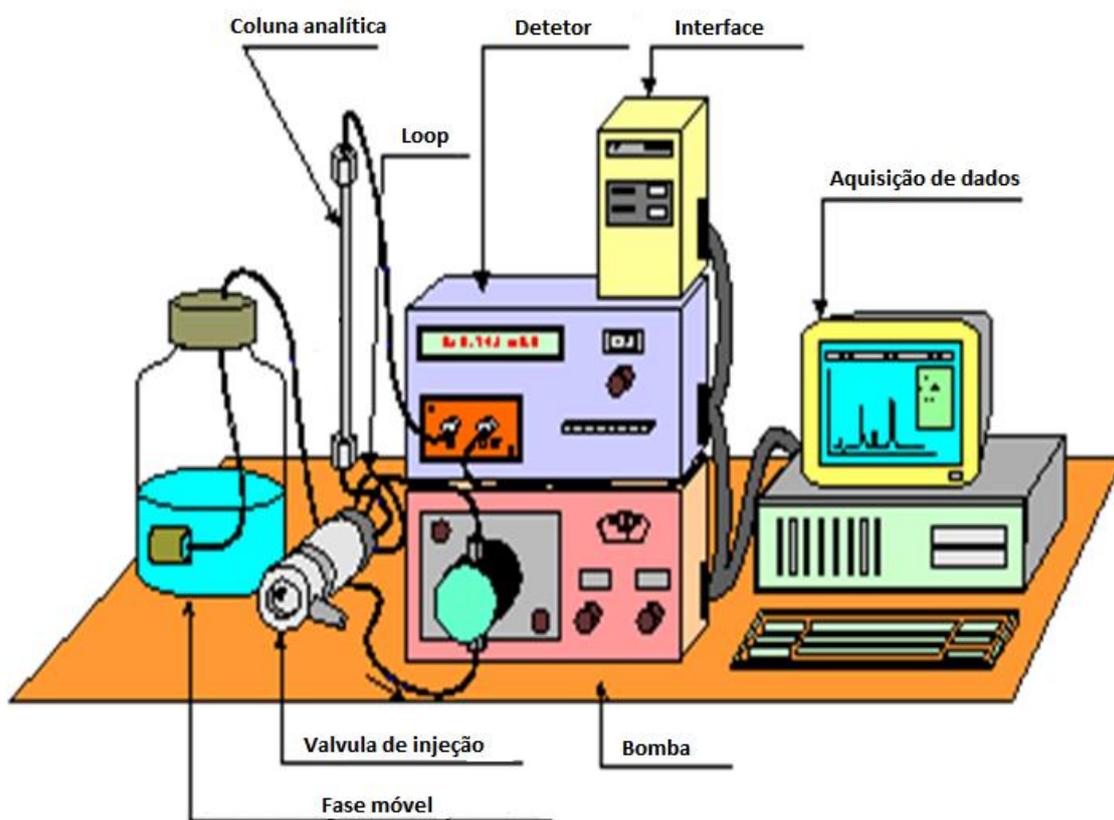


Figura 13- Representação de um Sistema Cromatográfico HPLC

A cromatografia por HPLC é uma das técnicas analíticas mais utilizadas na detecção dos estrogénios em ambientes aquáticos, podendo ser utilizada não só para a concentração ou

purificação dos analitos de interesse, mas também para a análise final de estrogénios extraídos de amostras de águas residuais (Desbrow & Brighty, 1998; Quinn *et al.*, 2004; Snyder *et al.*, 1999). Avanços instrumentais recentes permitiram a associação de HPLC à espectroscopia de massa (Quinn *et al.*, 2004).

3.3.2 – Condições experimentais

3.3.2.1 – Instrumentação

Foi utilizado um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) da Dionex, equipado com quatro bombas P680, injetor automático ASI-100 e detetor de ultravioleta PDA-100 (Fig. 14). Na separação dos compostos foi usada uma coluna analítica de fase reversa C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m, Restek Pinnacle, DB), com um fluxo de 0,8 mL min⁻¹ em condições isocráticas. A fase móvel consistiu numa mistura de acetonitrilo/água (45:55, v/v), e a quantidade de amostra injetada de 20 μ L, sendo o comprimento de onda de deteção escolhido de 200 nm.



Figura 14 - Sistema HPLC utilizado no estudo
(Fonte própria: Laboratório (6) de Farmácia da ESTESC)

3.3.2.2-Reagentes

A solução-padrão mãe (0,2500 g L⁻¹) composta por estrona (Sigma, 99%), 17 β-estradiol (Fluka, 97%), estriol (Sigma, 99%) e 17 α-etinilestradiol (Sigma, 98%) foi preparada em acetonitrilo (Panreac Química, SA). A partir desta solução mãe, foram preparadas seis soluções-padrão com concentrações no intervalo entre 0,05-10,00 mg L⁻¹ em água ultra-pura.

Após a sua preparação, todas as soluções foram desgaseificadas utilizando um banho de ultrassons, durante 15 minutos.

Posteriormente todas as soluções foram filtradas através de um filtro de membrana de 0,22 μm, antes da análise por HPLC.

3.3.2.2 – Desenvolvimento e adaptação das condições de análise por HPLC

As condições de separação, foram obtidas a partir da análise de cinco réplicas de seis soluções padrão., com 5 réplicas A tabela 6 mostra as equações das retas de calibração e respetivos coeficiente de correlação. O desvio- padrão relativo (RSD %) variou no intervalo 0,10 a 12,75 para a estrona, 0,58 a 16,58 para a estradiol, 2,85 a 6,91 para o estriol e 1,26 a 11,75para o etinilestradiol.

Tabela 6- Equações das retas de calibração e respetivos coeficientes de correlação dos estrogénios em estudo

Estrogénio	Equação da reta	Coefficiente de correlação (r ²)
Estrona	Y = 2,1438x + 0,0499	0,9999
Estradiol	Y = 2,4085x - 0,0804	0,9997
Estriol	Y = 2,2398x - 0,2404	0,9990
Etinilestradiol	Y = 2,081x - 0,059	0,9999

De acordo com a IUPAC, o limite de deteção, LD ou LOD, expresso em unidades de concentração C_{LD}, é derivado da menor medida observada X_{LD}, permitindo uma estimativa da concentração em que a deteção de um determinado analito pode ser distinguida do ruído de fundo e de forma confiável (Skook , West, & Holler, 1996).

Assim, os limites de detecção (LOD) para cada estrogénio foram determinadas de acordo com as equações abaixo indicadas (Miiller & Miller, 2005.XVI):

$$y = a + b x$$

$$\text{LOD} = Y_B + 3S_B$$

Equação 5

onde: $Y_B = a$; $S_B = S_{y/x}$; LOD, o valor de y no limite de detecção e $S_{y/x}$, o desvio-padrão (no eixo y).

3.3.4 – Resultados e discussão

Os valores de LOD obtidos foram de $0,45 \text{ mg L}^{-1}$ para o E3, $0,24 \text{ mg L}^{-1}$ para o E2, $0,11 \text{ mg L}^{-1}$ para o EE2 e $0,089 \text{ mg L}^{-1}$ para a E1. Os coeficientes de correlação das retas de calibração de cada estrogénio, foram sempre superiores a 0,999. A Figura 15 mostra um cromatograma onde se pode observar uma boa resolução entre os picos dos compostos em estudo.

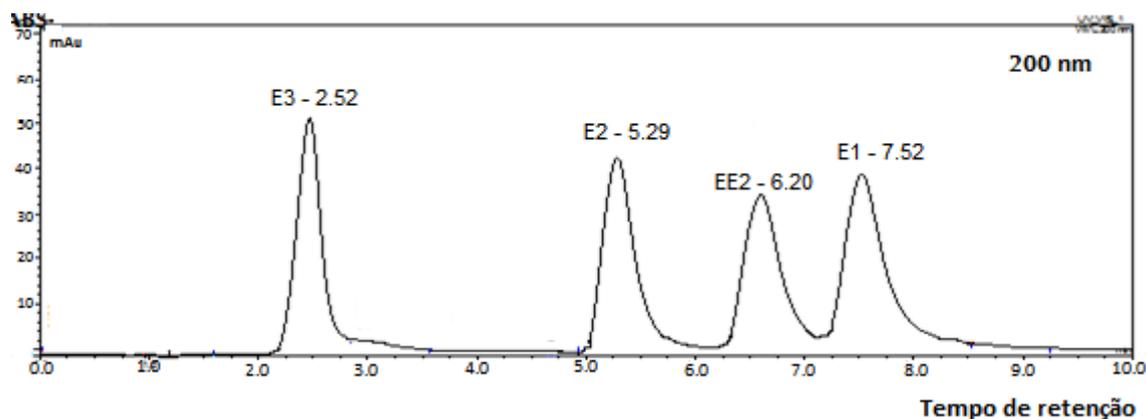


Figura 15- Cromatograma de uma solução-padrão dos estrogénios a uma concentração de 50 mg L^{-1} .

Depois da otimização das condições de separação, a quantificação dos quatro estrogénios em todas as amostras das águas residuais foi efetuada utilizando esta metodologia após a pré-concentração da amostra utilizando a extração em fase sólida.

3.4 – Electroforese Capilar (EC)

3.4.1 – Introdução

A electroforese capilar é uma técnica analítica que tem vindo a ganhar grande interesse e igualmente uma crescente aceitação, sendo largamente utilizada na separação de uma grande variedade de compostos, quer de moléculas grandes, quer de moléculas pequenas. Estas separações são baseadas nas diferenças entre as taxas de migração de espécies da amostra pela utilização de altas voltagens, as quais geram fluxos eletrosmóticos (soluções tampão) e eletroforéticos (componentes da amostra) dentro de um capilar de sílica fundida.

Os grupos silanol presentes na superfície do capilar são ácidos fracos, que se ionizam a partir de valores de pH 3-4 (estando totalmente ionizados em meio alcalino), criando uma superfície com carga negativa. Esta camada negativa na superfície atrai para a sua proximidade as espécies carregadas positivamente da solução, formando duas camadas, uma rígida positiva que é fixa e uma difusa (móvel) com carga global positiva, a qual será mobilizada pela presença do campo elétrico. Este fenómeno é denominado fluxo eletrosmótico (EOF) e o facto de ser uniforme contribui para a alta resolução da electroforese capilar (Skoog, Nieman, & Holler, Princípios de análise instrumental, 5ª edição).

Na electroforese capilar é possível empregar diversos modos de separação, cada qual com o seu mecanismo e seletividade característicos: electroforese capilar de zona (CZE), cromatografia electrocinética micelar, isotacoforese capilar, focalização isoelétrica capilar, electroforese capilar em gel e electrocromatografia capilar (Skoog, Nieman, & Holler, Princípios de análise instrumental, 5ª edição, 2002; Quirino *et al.*, 2002; Palmer *et al.*, 1999).

A configuração instrumental básica (Fig. 16) para a electroforese capilar é relativamente simples: um capilar de sílica fundida com uma janela ótica, uma fonte de energia de alta voltagem controlável, dois eléctrodos, dois reservatórios para os eletrólitos e um detetor.

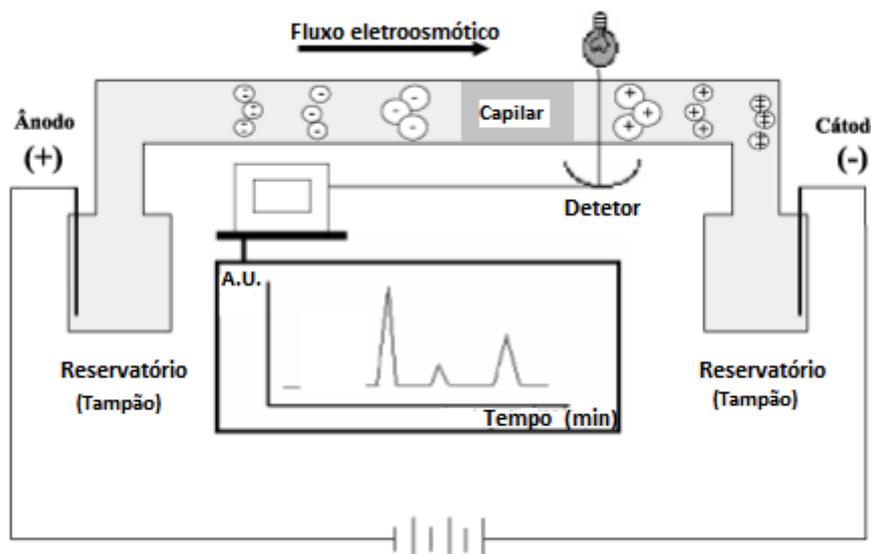


Figura 16- Representação esquemática de um Sistema de Electroforese Capilar
(adaptado de Skook, West, & Holler, 1996)

As extremidades do capilar são colocadas nos reservatórios de eletrólito – um tampão, e a janela ótica é alinhada com o detector (UV). Depois de encher o capilar com a solução tampão, substitui-se um dos reservatórios do tampão pelo da amostra a injetar no capilar. Existem duas formas diferentes de injetar a amostra, por injeção hidrodinâmica, onde a amostra é injetada usando a aplicação de uma pressão, e por injeção eletrocinética, baseada no facto de que quando se aplica uma voltagem, a amostra é introduzida no capilar devido à mobilidade electroforética. A quantidade de amostra injetada é controlada variando quer a pressão/voltagem, quer o tempo de injeção. Na extremidade do capilar, oposta à da injeção, é colocado um detector, normalmente UV-Vis ou de fluorescência. A resposta do detector em função do tempo de migração dá origem ao eletroferograma.

De salientar, que esta técnica analítica se tem revelado como uma ferramenta de separação de estrogénios muito atraente, em parte devido à sua alta resolução e eficiência, rapidez de execução, pequenas quantidades de amostra, e por outro lado pelo seu potencial de separar simultaneamente vários compostos em matrizes complexas ambientais, nomeadamente em afluentes e efluentes das ETARs (Regan *et al.*, 2003). Alguns investigadores têm ainda utilizado modificadores orgânicos para uma melhor separação dos estrogénios, nomeadamente ciclodextrinas, dodecilsulfato de sódio, colato de sódio, metanol e acetonitrilo (Palmer *et al.*, 1999; Regan *et al.*, 2003).

3.4.2 – Condições experimentais

3.4.2.1. Instrumentação

Todas as análises efetuadas por eletroforese capilar, foram realizadas utilizando o sistema Beckman P/ACE MDQ, equipado com um detetor de díodos (Fig. 17). A separação dos compostos foi realizada usando um capilar de sílica fundida, com 50 cm de comprimento total (40 cm de comprimento até à janela ótica), 50 µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo. Para a diminuição do ruído removeu-se, por queima, 1 mm do revestimento de polimida das extremidades do capilar, procedendo-se em seguida ao seu polimento utilizando uma placa de cerâmica.



Figura 17 – Equipamento de electroforese capilar utilizado no estudo, Beckman P/ACE MDQ (Fonte própria: Laboratório de Química Ambiental, Departamento de Química, Universidade de Aveiro)

3.4.3 – Desenvolvimento da metodologia analítica por EC

3.4.3.1 – Tampão, soluções-padrão, amostras para análise

O eletrólito de separação foi preparado diariamente, de forma a conter 10 mM de borato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) e ácido cólico 100 mM ($\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_5\text{Na}\cdot\text{H}_2\text{O}$), ambos da Sigma Aldrich, em água ultra pura, e com um pH final de 9,2. O tempo de utilização do eletrólito foi limitado a 2 dias, uma vez que após esse tempo, as suas características ficavam alteradas, afetando assim o poder separativo do método. A solução-padrão mãe, com a concentração de 2 g L^{-1} de estrona (Sigma, 99%), 17β -estradiol (Fluka, 97%), estriol (Sigma, 99%) e 17α -etinilestradiol (Sigma, 98%) foi preparada em metanol (Panreac Química, SA). A partir desta solução mãe, foram preparadas seis soluções-padrão com concentrações no intervalo entre 1,5-50,0 mg L^{-1} em solução eletrolítica. Após a sua preparação, todas as soluções foram desgaseificadas utilizando um banho de ultra-sons, durante 15 minutos.

O acondicionamento de um capilar novo foi efetuado da seguinte forma: lavagem com NaOH 1 M, durante 10 min, seguida de uma lavagem com NaOH 0,1 M, durante 30 min, lavagem com água ultra pura, durante 5 min e, por último, uma lavagem com eletrólito, durante 10 min. No entanto, para além do acondicionamento do capilar novo, foram efetuadas lavagens quer no início e final do dia, quer entre análises. As lavagens diárias consistiram em lavagens com NaOH 1 M, NaOH 0,1 M, água e eletrólito, durante 2 min cada, enquanto entre análises, apenas se procedeu à lavagem com NaOH 0,1 M, durante 5 min, água ultra pura, durante 2 min, e eletrólito durante 3 min. Todas as lavagens foram efetuadas à pressão de 20 psi e todas as soluções utilizadas foram filtradas, usando um filtro $0,22 \mu\text{m}$ de diâmetro de poro, antes de cada análise.

A lavagem efetuada no final de cada dia de análise, consistiu na passagem de NaOH 0,1 M, água e ar durante 10 min cada, com o objetivo de deixar o capilar em perfeitas condições para ser guardado e novamente utilizado.

3.4.3.1 – Condições de separação

Todos os padrões utilizados foram injetados utilizando um sistema de pressão de 0,3 psi durante 10 segundos. A separação eletroforética foi efetuada utilizando uma voltagem de 25 kv, durante 20 min, mantendo a temperatura do capilar a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, gerando uma corrente de cerca de $190 \mu\text{A}$. Os estrogénios foram detetados ao comprimento de onda de 214 nm, fazendo-se também a aquisição do seu espectro de absorção entre os 190 e 300 nm.

O eletrólito de separação foi utilizado no máximo 3 vezes seguidas, sendo substituído por eletrólito novo.

Na figura 18 pode-se observar uma boa separação entre os picos dos compostos em estudo, tendo-se optado por utilizar também esta técnica analítica no estudo de degradação dos estrogénios.

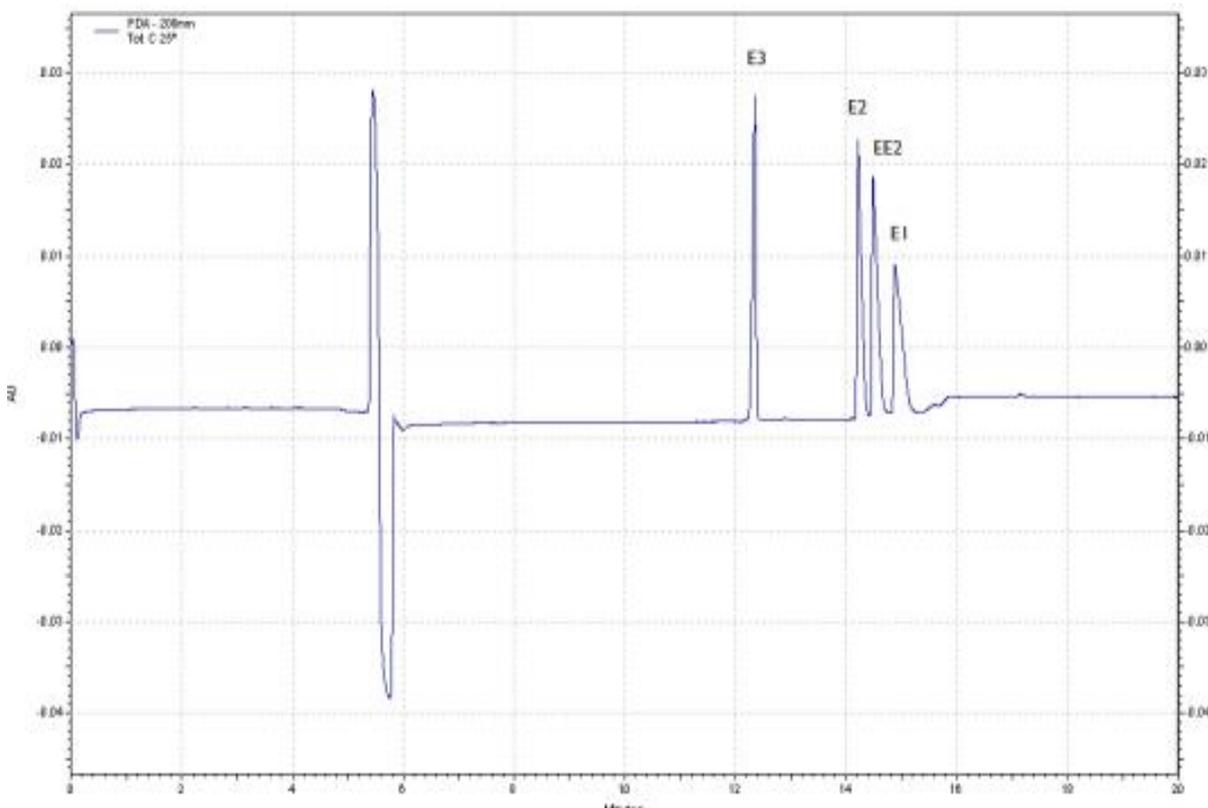


Figura 18 - Electroferograma de uma solução-padrão dos estrogénios a uma concentração de 50 mg L⁻¹ dos compostos alvo. (E3)-estriol; (E2)-estradiol; (EE2)-etinilestradiol, (E1)-estrona

(Fonte própria)

3.4.3.2. Eficiência do método

Sob condições otimizadas, a separação dos quatro estrogénios foi realizada, estando o tempo de migração de cada composto indicado na tabela 7.

Tabela 7- Tempos de migração de cada composto, sob condições otimizadas e com um intervalo de confiança de 95% (n=6)

Composto	Tempo de migração (min)	
E3	4,70	± 0,06
E2	5,9	± 0,1
EE2	6,0	± 0,1
E1	6,1	± 0,1

Para a determinação quantitativa das amostras, efetuou-se uma reta de calibração, para cada composto, com concentrações finais que variaram no intervalo entre 1,5 e 50,0 mg L⁻¹. Cada ponto da reta de calibração foi obtido através do valor médio de cada triplicado.

A eficiência do método foi avaliada, através do cálculo do coeficiente de correlação (r^2), limite de detecção (LOD) e linearidade (Lin (%) = 100 - RSD, onde RSD é o desvio padrão relativo).

3.4.4 – Resultados e discussão

Como já foi referido, para a obtenção das retas de calibração, prepararam-se 5 padrões que continham os quatro estrogénios, com concentrações no intervalo entre 1,5 e 50,0 mg L⁻¹.

O capilar utilizado na análise, o eletrólito e os métodos de lavagem efetuados foram os descritos no ponto anterior.

A tabela 8 mostra as respetivas retas de calibração e respetivos coeficientes de correlação, limite de detecção e linearidade, para cada composto estudado.

Tabela 8- Equações da reta de calibração e respetivos coeficientes de correlação dos estrogénios em estudo

Estrogénio	Equação da reta	Coeficiente de correlação (r^2)	LOD (mg L ⁻¹)	Lin (%)
Estrona	$y = (257 \pm 7)x + 184 \pm 187$	0,998	3,19	92,880
Estradiol	$y = (245 \pm 7)x + 195 \pm 176$	0,998	3,16	93,283
Estriol	$y = (232 \pm 7)x + 26 \pm 193$	0,998	3,65	92,634
Etinilestradiol	$y = (235 \pm 7)x + 69 \pm 176$	0,998	3,29	93,634

Como se verifica na tabela 8, todos os estrogénios apresentam um bom coeficiente de correlação, no intervalo de concentrações utilizado neste estudo. O LOD obtido foi de 3,19mg L⁻¹ para o E1, 3,16mg L⁻¹ para o E2, 3,65mg L⁻¹ para o E3 e 3,29 mg L⁻¹ para o EE2.

3.5 – Método radioimunoensaio

3.5.1 – Introdução

As técnicas biológicas nomeadamente as técnicas de imunoensaio, estão entre as técnicas analíticas mais sensíveis, de simples execução e rapidez, contudo o seu uso encontra-se limitado pelo número reduzido de anti-corpos específicos disponíveis e, devido à possibilidade de ocorrerem reações cruzadas, com outros compostos ou hormonas.

O método radioimunoenzimático (RIA) baseia-se na competição de um antigénio presente na amostra em análise com um antigénio marcado com isótopo radioativo pelo mesmo anticorpo (Fig. 19). A concentração do antigénio em análise será inversamente proporcional à radiação emitida. Trata-se de uma técnica com alta especificidade e sensibilidade, porém com elevado custo e grande risco operacional por serem manipulados materiais radioativos.



Figura 19 - Esquema ilustrativo do funcionamento do método radioimunoenzimático

Esta técnica utiliza uma metodologia de radioimunoensaio ^{125}I para uso em diagnósticos *in vitro* para a determinação quantitativa dos estrogénios no soro.

O kit de estradiol duplo anticorpo é um procedimento de radioimunoensaio sequencial no qual a amostra é pré-incubada com anti-corpo anti-estradiol. O estradiol marcado com ^{125}I compete com o estradiol na amostra pelos locais de ligação ao anticorpo. Após a incubação por um período fixo de tempo, a separação do antigénio livre é realizada pelo método de duplo anticorpo. Sendo um método competitivo, a fração não ligada é eliminada por decantação, sendo finalmente a fração ligada ao anticorpo contada, dado que se encontra marcada pelo isótopo radioativo de iodo.

3.5.2 – Condições experimentais

3.5.2.1. Instrumentação

Para todas as análises efetuadas, foi utilizado um contador Gamma da Siemens Medical Solutions Diagnostics, uma centrífuga refrigerada da JP Selecta, incubadora da marca Selecta, agitador Vortex da marca Selecta e micropipetas manuais da marca Eppendorf.

3.5.2.2. Reagentes

Para a determinação do estradiol, foi utilizado um Kit de Estradiol Duplo ^{125}I radioimunoensaio (PIKE2D-6), fornecido pela Siemens Medical Solutions Diagnostics contendo os seguintes reagentes: anti-corpo estradiol liofilizado (E2D1, 5E2D1); estradiol sintético iodado ^{125}I (E2D2), sete padrões de estradiol (E2D3-9), com concentrações de 0, 5, 10, 20, 50, 150 e 500 pg mL^{-1} em soro humano processado equivalente a 0, 0,02, 0,04, 0,07, 0,18, 0,55 e 1,84 nM L^{-1} e uma solução precipitante (N6, 5N6) que consiste em gama globulina de cabra anti-coelho.

Para a determinação da estrona foi utilizado um Kit de Estrone-RIA-CT (KIP19100) de uso diagnóstico *in vitro*, fornecido pela DIASource ImmunoAssays S.A., contendo os seguintes reagentes: estrona marcada com ^{125}I * estabilizada numa solução tampão, conservante de NaN_3 (< 0,1%); seis padrões de estrona, com concentrações de 0, 12,5, 25, 50, 125, 250, 750 pg mL^{-1} ; solução controle contendo soro humano e uma solução de lavagem concentrada (70 vezes).

* Isótopo de iodo radioativo que emite um fóton γ de 35 KeV de energia com um período de semidesintegração de 60 dias por captura eletrónica

3.5.2.3. Amostras para análise

Após a captura de indivíduos de rã-verde *Rana/Pelophylax perezii*, procedeu-se à recolha de amostras de sangue, utilizando seringas hipodérmicas para extrair cerca de 1 mL de sangue de cada indivíduo.

Após a recolha, o sangue foi transferido para um tubo para colheita de soro com gel de separação e ativador de coágulos, sendo acondicionadas numa arca frigorífica a 4°C, sendo posteriormente transportadas até ao laboratório, para respetivo processamento. Todas as amostras de sangue foram centrifugadas a 5000 g, numa centrífuga refrigerada da JP Selecta, a 4°C, durante 10 min, para total separação da fração de soro. O soro foi então retirado para eppendorfs de 1 mL e armazenados numa arca frigorífica a -20°C até às análises de E1 e E2 por RIA.

3.5.3 – Metodologia analítica com base em radioimunoensaio

As curvas de calibração são obtidas usando diferentes concentrações de padrões de antigénio, sendo os valores experimentais geralmente calculados através da equação 6, função logística de 4 parâmetros (4PL) (Dudley *et al*, 1985):

$$y = [(A - D) / (1 + (x / C)^B)] + D$$

Equação 6

onde:

y = valor do sinal

x = concentração de antigénio;

A = concentração do padrão zero

B = declive no ponto de inflexão

C = valor de concentração no ponto de inflexão

D = concentração do padrão em excesso

No entanto, a fim de comparar várias curvas padrão, os valores foram normalizados entre 100% (A) e 0% (D), que de acordo com a razão (Schneider *et al*, 2005):

$$Y_N = (Y - D)/(A - D) * 100$$

Equação 7

Onde Y_N é a resposta normalizada, A e D são parâmetros da equação 4PL (Schneider *et al.*, 2005), podendo ainda ser expressa pela seguinte razão:

$$\% B/B0$$

Equação 8

onde:

B- concentração do padrão zero (D)

B0 - concentração do padrão em excesso (A)

A sensibilidade pode ser expressa pelo LOD, geralmente considerado como a mais baixa concentração em que há produção de um sinal significativamente diferente do sinal do branco. Embora não haja nenhuma forma padronizada para definir o LOD, existe um consenso geral para selecionar a dose que inibe 10% do marcador de ligação da enzima ao anticorpo, ou seja, 90% B/B0. O limite de quantificação (LOQ) é considerado como sendo o valor, no qual os resultados quantitativos podem ser obtidos com uma precisão relativa, ou com um nível de confiança de 99,5%. Às vezes o LOD não está na gama linear da curva, sendo o LOQ selecionado, definido pelos limites superior e inferior da gama linear da curva dose-resposta (Hennion & Barcelo, 1998).

Tabela 9 – Parâmetros dos padrões do estradiol

Padrões	pg mL ⁻¹	nmol L ⁻¹	Média CPM*	B/B0 %
A	0	0	7609,60	100
B	5	0,02	6054,65	79,56
C	10	0,04	5478,15	71,90
D	20	0,07	4697,95	61,73
E	50	0,18	3740,75	49,15
F	150	0,55	2658,70	34,90
G	500	1,84	1528,55	20,08

*contagem por minuto

Tabela 10- Parâmetros dos padrões da estrona

Padrões	pg mL ⁻¹	nmol L ⁻¹	Média CPM*	B/B0 %
A	0	0	14535,65	100
B	12,5	0,05	12113,05	92,50
C	25	0,1	11191,20	81,90
D	50	0,2	9400,15	70,30
E	125	0,5	6441,55	52,60
F	250	1,0	4295,00	37,80
G	750	3,0	2029,75	17,90

*contagem por minuto

3.5.4 – Resultados e discussão

Após todo o procedimento indicado nos Kits, a fração ligada ao anticorpo é precipitada e contada no contador gamma. Cada leitura efetuada (3 réplicas) foi medida em contagem por minuto (cpm) e as curvas de calibração foram obtidas utilizando as diferentes concentrações de padrões de antígeno vs cpm (Graf. 1 e 2).

Gráfico 1 - Curva de calibração da estrona

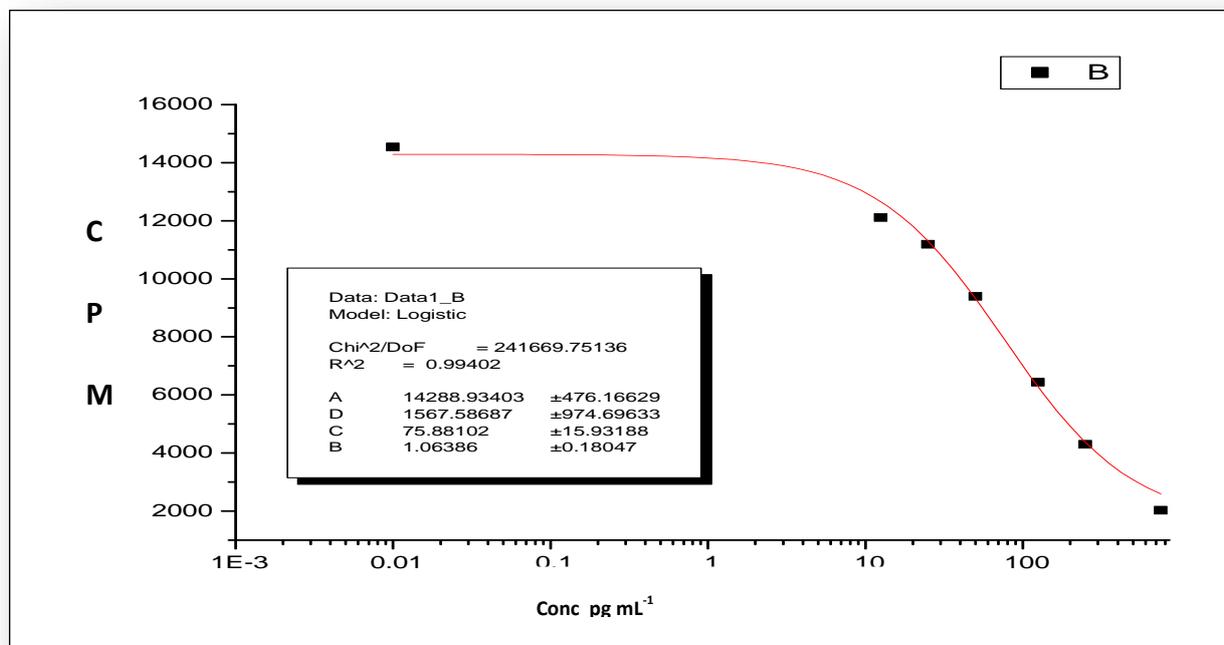
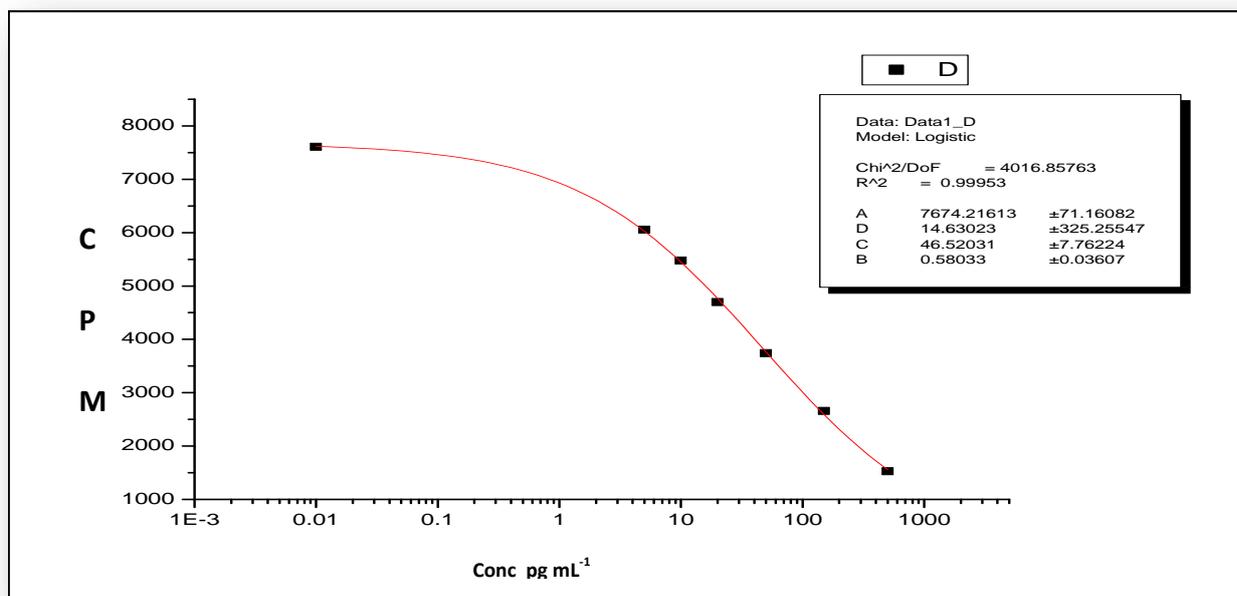


Gráfico 2 - Curva de calibração do estradiol



As curvas de calibração para os dois estrogénios mostraram um bom ajuste aos valores experimentais, sendo os valores dos coeficientes de correlação para cada estrogénio superiores a 0,999. Esta técnica foi utilizada na determinação da concentração de estrogénios de indivíduos da espécie *Rana/Pelophylax perezii*, descrito no capítulo VI desta dissertação.

3.6- Extração em Fase Sólida

3.6.1 - Introdução

Todos os métodos analíticos descritos na bibliografia consultada para a identificação e quantificação dos compostos alvo, são necessariamente antecedidos por um processo de pré-concentração e limpeza da amostra devido aos baixos níveis encontrados no ambiente. O processo de extração dos compostos estrogénicos pode ser realizado por dois processos: extração líquido-líquido ou extração por fase sólida (Alda & Barceló, 2001).

No entanto, a extração em fase sólida (SPE) é o processo de extração mais frequentemente utilizado para a extração de compostos estrogénicos em amostras de águas, tendo vindo a crescer significativamente e sendo considerado um excelente método de extração, concentração e limpeza das amostras. O desenvolvimento do processo de extração depende do tipo de fase sólida utilizada, bem como do tipo de analito (Fine *et al*, 2003; Kelly C, 2000).

O tipo de resina utilizada no SPE pode ser de fase normal ou fase reversa, sendo o analito em estudo retido pelo sorbente por adsorção/partição. A técnica de SPE em fase reversa baseia-se numa separação que envolve um analito numa matriz polar ou moderadamente polar (fase móvel) e uma fase estacionária apolar (adsorbente). O analito de interesse encontra-se entre o medianamente polar e o não polar ou apolar. As interações presentes neste tipo de separação são hidrofóbicas: interações apolar-apolar ou forças de dispersão de van der Waals. Os cartuchos utilizados em fase reversa apresentam grupos silanol hidrofílicos, na superfície de empacotamento de sílica, modificados quimicamente através da ligação a grupos funcionais hidrofóbicos. A retenção dos analitos orgânicos presentes em soluções polares (como por exemplo, a água) ao adsorbente deve-se, primordialmente, a forças atrativas entre a ligação carbono – hidrogénio do analito e os grupos funcionais da fase ligada (fase estacionária). Para eluir um composto adsorbido numa fase reversa, deverá utilizar-se um solvente não polar, que seja capaz de romper a ligação entre o analito e o adsorbente (Lazarov, 2006; Yan *et al*, 2009; Sarmah *et al*, 2006; Streck, 2009; Gabet *et al*, 2007).

Esta técnica envolve cinco etapas diferentes: a escolha do solvente mais adequado, o acondicionamento do cartucho, a adição da amostra, a lavagem do cartucho e a eluição dos compostos de interesse (Fig. 20).

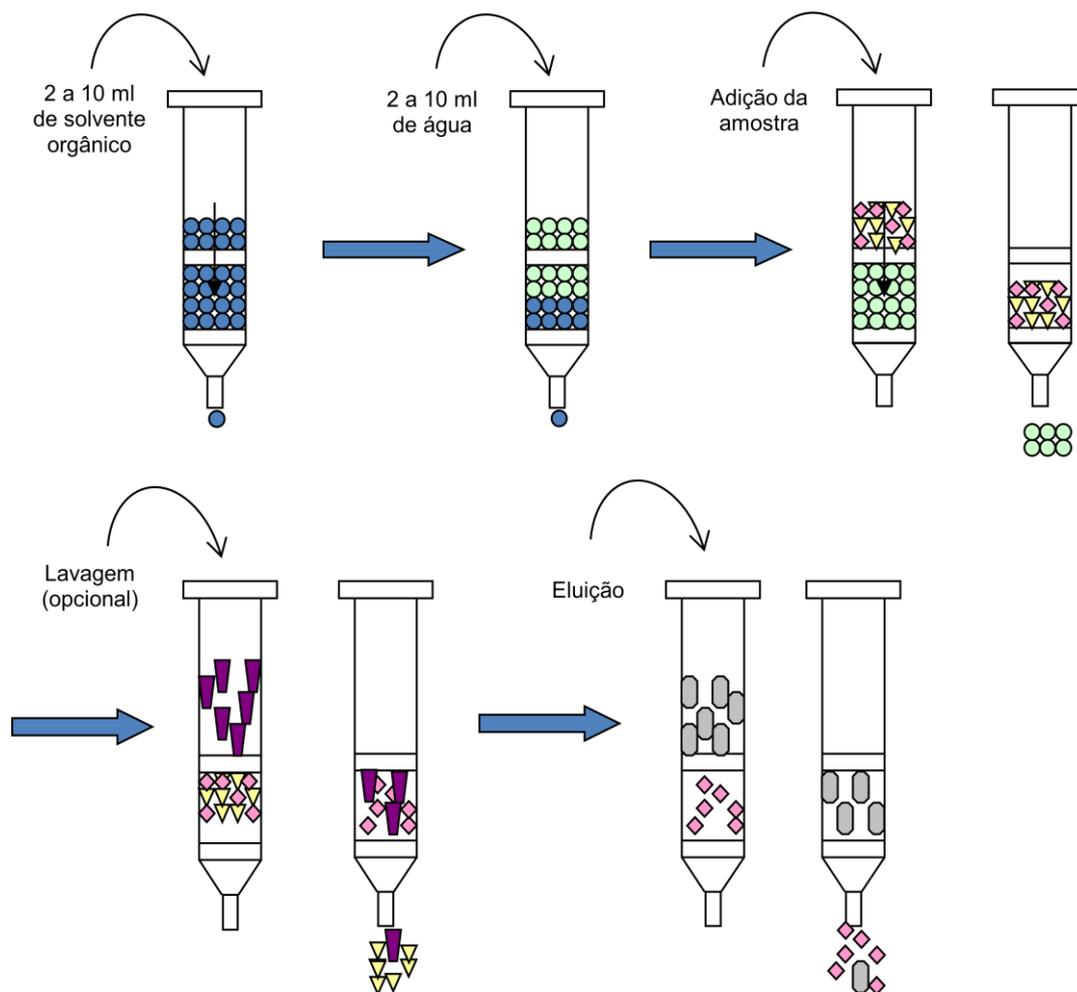


Figura 20 – Representação esquemática do processo de extração em fase sólida – utilizando uma fase reversa (Adaptado tese de Mestrado Diana Luísa Lima)

3.6.2 – Condições experimentais

Todo o processo de extração em fase sólida foi realizado utilizando um sistema de vácuo adequado da Sigma-Aldrich (NSW, Australia). Os cartuchos Strata-X C18 modificada (500 mg/6 mL) foram obtidos na Phenomenex (USA) (Fig. 21).



Figura 21- Sistema de vácuo utilizado na extração em fase sólida dos compostos alvo
(Fonte própria: Laboratório 6 da ESTESC)

Foram testados cinco métodos de SPE conforme tabela 11. Assim, diferentes tipos de acondicionamento e lavagem dos cartuchos foram testados, bem como o pH da solução padrão (amostra) e do tipo de solvente para a eluição final. Em todos os métodos testados, foi utilizado um volume de $1000,0 \pm 0,4$ mL de soluções-padrão de estrogénios, com uma concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada, e acidificadas com ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. As soluções foram passadas através dos cartuchos (um cartucho para cada solução), com um fluxo de 4 ml/min e uma pressão de 400 mbar. A escolha do valor de pH das soluções utilizadas para cada método testado foi a descrita na literatura consultada (Palmer *et al*, 1999; Ternes *et al*, 1999; Zhang *et al* 2006; Sarmah *et al*, 2006; Vulliet *et al*, 2007; Laganá *et al*, 2004; Regan *et al*, 2003).

Após eluição, as amostras foram devidamente secas usando vácuo, recorrendo-se a uma bomba de vácuo, e em seguida redissolvidas em 2 mL de metanol ou acetonitrilo antes da sua análise por HPLC-UV.

Tabela 11- Descrição dos procedimentos de SPE testados, para uma concentração de 20,00 ug L⁻¹ de cada estrogénio

	Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Método 5
Acondicionamento dos cartuchos de SPE	2×4 mL metanol 2×4 mL água	5 mL metanol 5 mL água	2×2,5 mL acetona 2×2,5 mL metanol 2×5 mL água	3×2 mL hexano 2 mL acetona 3×2 mL metanol	3 mL metanol 3 mL água
pH das soluções- padrão dos estrogénio	3	2	5	3	2
Lavagem dos cartuchos	2×5 mL metanol:água (1:1) 2×5 mL acetona:água (1:2)	5 mL água	25 mL hexano e água (1:4)	5×2 mL água	2×10 mL água
Eluição	2×4,5 mL metanol	10 mL acetonitrilo	2×10 mL acetona	4 x1 mL acetona	20 mL metanol
Secagem completa dos solventes	Vácuo	Vácuo	Vácuo	Vácuo	Vácuo
Redissolução dos estrogénios	2 mL metanol	2 mL acetonitrilo	2 mL metanol	2 mL metanol	2 mL metanol

3.6.3 – Condições operacionais: desenvolvimento da metodologia de SPE

3.6.3.1. Recuperação dos estrogénios utilizando os procedimentos de SPE testados

Os ensaios de recuperação são definidos como sendo a proporção do composto de interesse presente ou adicionada, que é extraída e passível de ser quantificada, sendo as taxas de recuperação aceitáveis entre intervalos compreendidos entre 70 e 120% (Thompson *et al*, 1999).

As taxas de recuperação de cada estrogénio foram calculadas comparando-se com os valores das concentrações das soluções-padrão dos estrogénios com as esperadas depois de se ter efetuado ao concentração por SPE (Tab. 12).

Tabela 12- Resumo dos valores das taxas de recuperação dos estrogénios alvo, após SPE e com uma concentração de 20.00 µg L⁻¹ (n=3).

	Recuperação %				
	Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Método 5
Estrona (E1)	25-35	100-120	60-70	40-50	120-140
RSD % ¹	24	13	11	16	11
Estradiol (E2)	26-33	85-110	61-68	42-49	110-135
RSD %	17	18	8	17	14
Estriol (E3)	25-29	90-110	65-70	42-49	111-135
RSD %	10	14	5	11	14
17α-etinilestradiol (EE2)	27-35	90-120	64-70	45-49	121-138
RSD %	17	18	6	6	9

¹RSD % = desvio padrão relativo

Um dos fatores que se torna relevante na capacidade de ligação do analito à fase estacionária, é o pH, a que se encontra cada amostra, assim, o método 2 (pH 2), foi escolhido, uma vez que mostrou altas taxas de recuperação, variando entre 100 e 120% para E1, 85 e 110% para E2, 90 e 120% para EE2 e 89,8 e 110% para a E3. Neste método, os cartuchos foram acondicionados com 5 mL de metanol, seguido de 5 mL de água ultra-pura. Cada amostra de 1000,0 ± 0,4 mL, acidificada a pH 2 com ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹, foi passada através de um cartucho de SPE com um fluxo de 4 mL/min e uma pressão de 400 mbar. Na limpeza e lavagem do cartucho utilizou-se o volume de 5 ml de água ultra-pura. Posteriormente, os cartuchos foram secos, recorrendo a uma bomba de vácuo durante 2 horas, sendo a eluição realizada apenas no dia seguinte.

A eluição foi realizada adicionando 10 mL de acetonitrilo, sendo o eluato completamente seco sob vácuo, e o extrato redissolvido em 2 mL de acetonitrilo. Todos os extratos foram filtrados através de um filtro de membrana de 0,22 µm antes de serem analisados por HPLC.

3.6.3.2 Otimização do processo de SPE escolhido

Na otimização deste método prepararam-se três soluções (1000,0 ± 0,4 mL), com os estrogénios alvo, com as concentrações iniciais de 20 µg L⁻¹, 10 µg L⁻¹ e, 1 µg L⁻¹ (tabela 13) que foram, posteriormente, sujeitas a SPE. Para cada concentração, o procedimento foi repetido três vezes e analisadas por HPLC-UV (n=3).

Os coeficientes de correlação (tabela 13) foram calculados através do ajuste de uma reta da área do pico de cada composto obtida após o procedimento de SPE-HPLC em função da concentração da solução original.

Tabela 13 - Taxas de recuperação dos estrogénios alvo a diferentes concentrações (n=3), após Extração em Fase Sólida

	Concentrações testadas	Estrona		Estradiol		17 α -etinilestradiol		Estriol	
		Rec % ¹	RSD (%) ²	Rec %	RSD (%)	Rec %	RSD (%)	Rec %	RSD (%)
Amostra água	20 $\mu\text{g L}^{-1}$	110,0	0,3	115,2	0,4	116,1	0,7	101	1
	10 $\mu\text{g L}^{-1}$	110,10	0,06	111,0	0,8	120,1	0,7	97,30	0,05
	1 $\mu\text{g L}^{-1}$	115	1	106,20	0,06	110	1	85,4	0,1
	Coefficientes de correlação	0,9977		0,9993		0,9993		0,9998	

¹Rec % - recuperação

²RSD % = desvio padrão relativo

3.6.4 – Resultados e discussão

As taxas de recuperação para os quatro estrogénios estão compreendidas no intervalo entre 85% e 120%, para a gama de concentrações testadas. Os valores de RSD de todos os ensaios de recuperação foram inferiores a 1,47%, com um número de réplicas das amostras (90%) com RSD < 0,79%. Os valores dos coeficientes de correlação para cada estrogénio foram superiores a 0,998, considerando-se muito bom, tendo sido este procedimento o aplicado na extração dos estrogénios nas amostras de águas residuais, à entrada e saída das ETARs em estudo.

Capítulo IV – Determinação dos estrogénios alvo em afluentes e efluentes das ETARS

4.1- Estações de Tratamento de Águas Residuais

4.1.1 – Caracterização das Estações de Tratamento de Águas Residuais

Uma ETAR (Fig. 23) define-se como sendo uma infraestrutura que trata as águas residuais de origem doméstica e/ou industrial, chamados genericamente de esgotos sanitários ou esgotos de descargas industriais, sendo depois os efluentes escoados para os rios ou mar. Assim, uma ETAR é naturalmente o destino mais adequado à promoção da saúde pública e à preservação dos recursos hídricos, de modo a evitar a sua contaminação e, conseqüentemente, efeitos nocivos nas populações e ambiente (Ferreira, 1982).

Neste contexto, uma ETAR deverá ter como principal objetivo, o tratamento final das águas residuais produzidas pelas populações, permitindo uma possível reutilização destas, através de um processo longo e faseado de tratamento adequado (Ferreira, 1982; Maaskant *et al.*, 1999).



Figura 22- Exemplos de Estações de Tratamento de Águas Residuais

Atualmente, a presença de diversos compostos, considerados micro-poluentes, têm sido alvo de muitas pesquisas e estudos, sendo sistematicamente descritos como a causa de danos à saúde humana e de animais, a diversos níveis, e, como já foi referido anteriormente, uma grande preocupação mundial. Todos os tipos de tratamentos que podem remover eficientemente esses compostos dos ambientes aquáticos, têm igualmente sido bastante investigados em vários países. No entanto, deve-se ter uma preocupação acrescida e consciente, não só na sua eliminação, mas também na consequente destruição do efeito potencial nocivo. Estudos demonstram a presença de disruptores endócrinos em ambientes aquáticos, ou seja, compostos que não são completamente removidos, tornando-se necessário uma avaliação urgente da eficiência de remoção destes compostos, nos processos de tratamento que são utilizados nas diferentes ETARs (Maot, 2000a; Maot, 2000b; Vieira *et al.*, 2007a; Vieira *et al.*, 2007b).

4.1.2 – Tipos de tratamento das Estações de Tratamento de Águas Residuais

A escolha de um sistema de tratamento de águas residuais é determinada por vários fatores: características quantitativas e qualitativas das águas residuais, localização do sistema e objetivos de qualidade que se pretendem, impondo assim o grau de tratamento adequado. Globalmente, o tratamento de águas residuais utilizado numa ETAR consiste em quatro fases, designadamente: um tratamento preliminar, primário, secundário e terciário.

4.1.2.1 – Tratamento primário

A primeira fase do tratamento de águas residuais, tratamento preliminar e tratamento primário, é constituída por duas grades (gradagem), um desareador (desarenação), um desengordurador (desengorduramento) e um canal Parshall. Todas as operações unitárias envolvidas neste pré-tratamento têm como objetivo a remoção de sólidos grosseiros, flutuantes e sedimentáveis, de maiores dimensões que as aberturas dos equipamentos utilizados (grades), impedindo ainda a flutuação de detritos nos órgãos a jusante (decantadores), o entupimento de canalizações e o desgaste ou bloqueamento de equipamentos mecânicos. As operações unitárias de desarenação e desengorduramento têm como finalidade remover as areias e gorduras existentes na água residual, respetivamente. A instalação de um descarregador tipo Parshall permite o controlo da velocidade, sendo uma das formas mais utilizadas para a criação de mistura hidráulica (Ferreira, 1982; Ministério do Ambiente, 2004; Maot, 2000a; Maot, 2000b; Maaskant *et al.*, 1999; Vieira *et al.*, 2007a; Vieira *et al.*, 2007b).

4.1.2.2 – Tratamento secundário

O tratamento secundário tem à sua disposição várias tecnologias que funcionam sobre princípios semelhantes, destacando-se os sistemas aeróbios intensivos, quer por biomassa suspensa (microrganismos - lamas ativadas), quer por biomassa fixa (leitos percoladores e biodiscos ou discos biológicos), e lagunagem. No sistema de leitos percoladores, após o tratamento preliminar, o efluente passa pelo decantador primário até chegar ao leito percolador de enchimento variável. Aqui, o efluente entra num distribuidor rotativo e vai criar um filme biológico (no leito) constituído por um aglomerado de bactérias que provocam a decomposição da matéria orgânica. Quando o efluente é escoado, pode ser efetuada a recirculação em torno do leito percolador, ou a descarga no meio recetor. No entanto, a recirculação deve ser efetuada a partir do efluente tratado proveniente do decantador secundário, pois neste caso a matéria orgânica encontra-se diluída e, por conseguinte, não se

correm riscos de o leito percolador sofrer colmatção dos espaços vazios de enchimento. O sistema de lamas ativadas é semelhante, ou seja, o efluente do tratamento preliminar é encaminhado para o decantador primário, seguindo para o tanque de arejamento, geralmente com recirculação permanente. O efluente é então conduzido para o decantador secundário, e a partir daí parte do efluente é descarregado numa linha de água e, outra parte constitui a recirculação ao tanque de arejamento. A eficiência do tratamento é otimizada no caso da recirculação de lamas para o tanque de arejamento ser efetuada do fundo do decantador secundário, pois a matéria orgânica encontra-se concentrada e, assim, aumenta a concentração de biomassa no tanque de arejamento, possibilitando aos microrganismos uma nova oportunidade para degradarem o substrato (matéria orgânica) (Ferreira, 1982; Ministério do Ambiente, 2004;).

O processo de injeção de ar ou oxigénio puro para misturar a lama a tratar com a água residual, e fornecer o oxigénio suficiente para os microrganismos degradarem os compostos orgânicos é conhecido como arejamento. A adição de oxigénio é também importante, como meio de remoção de alguns poluentes como ferro, manganês e dióxido de carbono, assim como na oxidação química, eliminando compostos orgânicos que resistam aos processos biológicos. Serve também como meio de repor os níveis de oxigénio na água residual antes de rejeitá-la para o meio recetor. Os biodiscos ou discos biológicos são a evolução natural dos leitos percoladores. Trata-se de um sistema que recorre também a processos biológicos aeróbios de degradação da matéria orgânica, em filme fixo, à semelhança dos leitos percoladores. O filme está preso ao disco, mas como é preciso uma grande área de contacto, juntam-se vários discos paralelos de reduzida espessura, com rugosidade, para permitir uma maior aderência dos microrganismos. Os discos mergulham parcialmente num canal com água residual enquanto giram, garantindo que os microrganismos estão alternadamente em contacto com o ar e matéria orgânica (Ferreira, 1982; Ministério do Ambiente, 2004; Maaskant *et al.*, 1999; Maot, 2000a; Maot, 2000b).

A lagunagem é, de todos os processos, o que mais se aproxima da simulação das condições naturais. A água residual atravessa uma série de lagoas (anaeróbias, facultativas, maturação – remoção de organismos patogénicos), onde os processos são idênticos aos que se dão nos meios aeróbios e anaeróbios. As lagoas arejadas são uma técnica intermédia que conjuga características da lagunagem e das lamas ativadas. No entanto, a técnica de lagunagem não é muito utilizada, o que talvez se explique pelo facto de necessitar de grandes áreas e, de estar

muito dependente das condições naturais, “fugindo” ao controlo humano, além da emissão de odores. Como vantagens há a referir a simplicidade e economia da construção e manutenção da unidade (Ferreira, 1982; Ministério do Ambiente, 2004; Maaskant *et al.*, 1999; Vieira *et al.*, 2007a; Vieira *et al.*, 2007b).

4.1.2.3 – Tratamento terciário

A opção de tratamento terciário, onde as águas residuais sofrem um tratamento de desinfeção e controlo de nutrientes, aparece, no contexto do saneamento básico em Portugal, como um “luxo”, dadas as dificuldades de tratamento a níveis mais básicos. Entre as opções de desinfeção aplicadas, principalmente, quando se pretende a reutilização das águas residuais, utiliza-se cloro, ozono e canal de ultravioletas (U.V.). A cloração é o sistema de desinfeção mais vulgar, sendo também o mais económico. Este método é eficaz na eliminação de bactérias, sendo porém bastante ineficaz na eliminação dos vírus, sendo uma desvantagem em questões ambientais e de saúde pública. Semelhantes desvantagens, embora a uma escala menor, apresenta a desinfeção por ozono, mais dispendiosa que a cloração. O ozono não se mantém muito tempo na água, no entanto, formam-se no processo subprodutos contaminantes que se mantêm na água tratada. Finalmente, o sistema de desinfeção por ultravioletas, igualmente mais dispendioso que a cloração, é uma tecnologia mais recente que não produz quaisquer resíduos tóxicos e obtém ótimos resultados na destruição de vírus e bactérias, apresentando-se a solução mais adequada para um tratamento terciário (Ferreira, 1982; Ministério do Ambiente, 2004; Maaskant *et al.*, 1999; Vieira *et al.*, 2007a; Vieira *et al.*, 2007b). Por norma, o tratamento terciário torna-se indispensável, no caso do meio recetor, onde é efetuada a descarga de água residual tratada, ser um meio sensível, isto é, sujeito a eutrofização (enriquecimento excessivo de algas devido à introdução de nutrientes, azoto e fósforo, provenientes da água residual), sendo necessária a remoção de nutrientes da água residual (Ferreira, 1982; Maaskant *et al.*, 1999; Vieira *et al.*, 2007a; Vieira *et al.*, 2007b; Ministério do Ambiente, 2004).

4.1.2.4 – Outros tratamentos

A conceção de novas instalações de tratamento de águas residuais deve incluir processos de remoção de nutrientes, sendo esta necessidade imposta, quer por uma questão de ética ambiental, quer pelo facto de a legislação em vigor assim o exigir, quer ainda pela tecnologia e o “know-how” para a sua concretização se encontrar disponível. Embora Portugal não tenha ainda atingido a capacidade de reutilização da água tratada para consumo humano direto, as

diversas técnicas atualmente disponíveis permitem reutilizar com toda a segurança a água tratada para diversos fins, até porque todo o tratamento da água efetuado tem como objetivo assegurar a sua potabilidade, ou seja, proteger a saúde pública tornando-a tão agradável à vista e ao paladar quanto possível, e evitar a destruição dos materiais do sistema de abastecimento de água (Ferreira, 1982; Ministério do Ambiente, 2004; Maaskant *et al.*, 1999; Vieira *et al.*, 2007a; Vieira *et al.*, 2007b).

4.1.3 – Descrição das Estações de Tratamento de Águas Residuais em estudo

Todas as ETARs que foram incluídas neste estudo, têm tratamento secundário, sendo que o tratamento primário destina-se a reduzir óleos, gorduras, areia, e sólidos (este passo é inteiramente mecânico, por meio de filtração e sedimentação) e o tratamento secundário planeado para degradar substancialmente o teor de matéria orgânica proveniente dos esgotos.

Os resíduos sólidos orgânicos (lamas) são rejeitados ou reutilizados noutras atividades (ex. agricultura). Depois deste 2º tratamento, os efluentes finais são lançados nos rios ou no mar. Contudo, as ETARs são sistemas não-lineares, sujeitos a grandes perturbações de fluxo e de peso, em conjunto com a incerteza associada à composição dos efluentes de entrada. De referir que de todas as ETARS estudadas, a ETAR da Marinha Grande possui o canal de ultravioletas (U.V.).

4.1.4 – Os estrogénios no ambiente aquático

A monitorização de estrogénios no meio ambiente tem vindo a ganhar grande interesse, especialmente pelo facto de frequentemente serem detetados nas ETARs, águas para consumo humano, rios, lagos, etc., em concentrações na faixa dos $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} . A presença destes compostos na água pode causar efeitos adversos na saúde, seja humana ou de outros organismos presentes nas águas, como os peixes (Ying *et al.*, 2002; Desbrow & Brighty, 1998; Solé *et al.*, 2003; Ternes *et al.*, 1999; Solé *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2004).

O 17α -etinilestradiol, um dos compostos vulgarmente encontrados na composição das pílulas de contraceptivos orais, foi detetado em algumas amostras de efluentes (Ying *et al.*, 2002; Solé *et al.*, 2002; Alda & Barceló, 2001). Como já foi referido, este composto poderá ser eliminado

do organismo através da urina e bÍlis na forma conjugada com ácido glucurónico ou com arilsulfatos. Assim, a exposição destes conjugados do etinilestradiol à atividade enzimática de β -glucuronidases, durante o processo de tratamento das águas residuais, poderá libertar o composto na sua forma ativa para o meio ambiente (Ying *et al*, 2002; Solé *et al*, 2003). Estudos sobre a biodegradação deste composto indicam que ele é bastante estável e persistente nos efluentes das estações de tratamento apresentando uma solubilidade em água pura de 4,7 mg L⁻¹. Este composto sintético é cerca de três vezes menos solúvel que os estrogénios naturais o que poderá explicar em parte a maior resistêncÍa deste composto à biodegradação quando comparado com os restantes (Ying *et al*, 2002; Solé *et al*, 2002). Os resultados obtidos a partir de estudos experimentais na análise quantitativa de 17 α -etinilestradiol em efluentes, foram em geral, inferiores às concentrações necessárias para que aquele composto fosse o único responsável pela magnitude de indução dos efeitos observados, nomeadamente no que diz respeito à produção de vitelogenina em peixes machos expostos (Ying *et al*, 2002).

Também nestes estudos, ficou demonstrada a perturbação fisiológica que estes compostos esteróides poderão induzir na produção de vitelogenina (Orn *et al*, 2003; Solé *et al*, 2002; Solé *et al*, 2003; Larsson *et al*, 1999; Versonnen & Janssen, 2004; Nakari, 2004; Robinson *et al*, 2002; Halm *et al*, 2002).

A potência relativa dos diferentes compostos estrogénicos na indução da produção de vitelogenina é: 17 α -etinilestradiol > 17 β -estradiol > estrona (Larsson, *et al.*, 1999). De acordo com as concentrações de 17 α -etinilestradiol determinadas no efluente analisado e, face à relação atrás referida, aquele composto poderá ser o principal responsável pelos efeitos estrogénicos observados sobre os indivíduos de *Oncorhynchus mykiss* (*O. Mykiss*) expostos a um efluente de uma estação de tratamento de águas residuais da Suécia (Larsson *et al*, 1999). Neste estudo procedeu-se ainda, à análise de vitelogenina na bÍlis dos peixes expostos, tendo-se verificado que apresentavam concentrações de compostos estrogénicos cerca de 104 a 106 vezes superiores às concentrações determinadas no efluente. Esta observação sugere que, a exposição a diferentes estrogénios ambientais poderá conduzir à acumulação de quantidades consideráveis desses compostos nos indivíduos expostos (Larsson *et al*, 1999).

Fêmeas de *Cyprinus carpio* (*C. carpio*) expostas a efluentes de estações de tratamento de águas residuais apresentaram níveis plasmáticos de vitelogenina inferiores aos controlos, provavelmente devido à ação de xenostrogénios que estimulam um *feedback* negativo para a secreção de gonadotrofina, diminuindo assim a produção de vitelogenina. Outro mecanismo

que poderá estar envolvido na menor produção de vitelogenina nas fêmeas expostas a compostos estrogénicos poderá passar pela ligação do xenostrogénio ao recetor hepático de estrogénios com diminuição da sua expressão (Solé *et al*, 2003).

Verificou-se que os machos de *Pimephales promelas* (*P. promelas*) expostos a 17 β -estradiol apresentavam valores de vitelogenina significativamente superiores aos valores apresentados pelos peixes controlo e que, após exposição durante 14 dias, os valores obtidos para a vitelogenina plasmática revelaram a existência de uma relação dose/resposta. Os peixes expostos a 320 ng L⁻¹ de 17 β -estradiol durante 14 dias apresentaram valores de vitelogenina cerca de 1000 vezes superiores aos peixes controlo (Halm *et al*, 2002).

Num estudo conduzido sobre indivíduos de *Danio rerio* (*D. rerio*) expostos a 17 α -etinilestradiol (1-25 ng L⁻¹) verificou-se um aumento dose-dependente dos níveis de produção de vitelogenina a partir dos 2 ng L⁻¹, e uma alteração na relação entre o nº de indivíduos de cada sexo. O desvio observado era favorável às fêmeas a partir da concentração de 1 ng L⁻¹. Para concentrações iguais ou superiores a 2 ng L⁻¹, observou-se uma total reversão de sexo, não se tendo observado qualquer peixe com tecidos típicos de intersexo em qualquer das concentrações testadas. Em todos os grupos testados houve sempre indivíduos cujo sexo não se conseguiu determinar. Noutros estudos, a exposição crónica de peixes *D. rerio* a uma diluição de 20% de um efluente de uma estação de tratamento primário de águas residuais e de *P. fulvidracus* a 17 β -estradiol (através alimentação), provocou uma alteração estatisticamente significativa na relação entre o nº de indivíduos de cada sexo, sendo o desvio observado favorável às fêmeas e sem que, mais uma vez, se observasse qualquer peixe com tecidos indicadores de intersexo (Park *et al*, 2004; Nakari, 2004).

O mecanismo pelo qual ocorre a reversão de sexo nestes indivíduos não é conhecido. O impacto dos estrogénios exógenos na diferenciação sexual de peixes foi estudado intensivamente e é óbvia a sensibilidade dos peixes perante tratamentos com esteróides antes de ocorrer a sua diferenciação sexual. Estes conhecimentos são amplamente empregues com intuíto económicos em aquacultura, para a produção preferencial de um dos sexos. O tratamento hormonal durante o período em que as gónadas se encontram indiferenciadas requer, entre outros fatores, uma combinação ótima entre a quantidade mínima do estrogénio, a duração da exposição e o estágio do ciclo de vida em que o indivíduo é exposto (Orn *et al*, 2003; Park *et al*, 2004; Solé *et al*, 2002).

Verificou-se também, em vários estudos, que o 17β -estradiol afeta nos peixes o desenvolvimento das gónadas dos machos e das fêmeas (Robinson *et al*, 2003; Halm *et al*, 2002; Kinnberg & Bjerregaard, 2003). Nos machos de *P. promelas* constatou-se a existência de uma relação dose/resposta negativa entre a exposição durante 14 dias ao 17β -estradiol e o crescimento das gónadas. O mecanismo pelo qual o 17β -estradiol inibe o crescimento testicular é desconhecido, no entanto, suspeita-se que os estrogénios e os compostos que apresentam atividade estrogénica, possam influenciar a síntese e libertação da hormona gonadotrófica. Também os machos adultos de *Poecilia reticulata* (*P. reticulata*) expostos a 17β -estradiol apresentaram alterações na estrutura dos testículos com uma diminuição de cistos espermatogénicos e abundância de espécies dos últimos estádios da espermatogénese (Kinnberg & Bjerregaard, 2003). Os efeitos observados poderão ser interpretados como uma inibição das divisões mitóticas das espermatogónias em consequência das exposições, contudo, o mecanismo pelo qual decorre esta inibição não é conhecido. Na enguia *Anguilla japonica* pensa-se que a sequência dos eventos da indução hormonal da espermatogénese se inicia com a estimulação da gonadotrofina, sobre as células de Leydig para a produção de androgénios, os quais se ligam a recetores nas células de Sertoli activando-as para a produção de activinina B, a qual por sua vez, atua nas espermatogónias para induzir mitose. Assumindo que este processo é semelhante em machos de outras espécies, os efeitos observados nos estudos descritos indicam uma disrupção neste processo de regulação hormonal (Kinnberg & Bjerregaard, 2003).

Os machos de *P. promelas* expostos a 320 ng L^{-1} de 17β -estradiol não desenvolveram os caracteres sexuais secundários, o que poderá evidenciar a ação daquele composto na feminização ou um atraso na maturação sexual dos machos expostos (Robinson *et al*, 2003; Halm *et al*, 2002).

No estudo desenvolvido com *Pelagius minutus* (*P. minutus*) verificou-se uma redução no nº de ovos férteis produzidos pelas populações expostas ao etinilestradiol. Esta situação poderá dever-se a uma diminuição da fertilidade individual e à diminuição da fecundidade dos ovos (maior nº de ovos não fertilizados), mas também por diminuição do nº de ovos depositados (Versonnen & Janssen, 2004; Robinson *et al*, 2002).

Apesar de nem todos os estudos revelarem alteração no nº de ovos depositados nos grupos de peixes expostos, face aos grupos controlo (Koger *et al*, 2000), verifica-se sempre alteração no nº de ovos que eclodem com sucesso (Solé *et al*, 2002; Robinson *et al*, 2003; Koger *et al*, 2000).

A alteração no comportamento da postura poderá ser resultado de efeitos sobre as fêmeas (que não produzem vitelogenina ou não ovulam na presença do etinilestradiol, por alteração nos seus ciclos hormonais normais) ou sobre os machos (atraso ou inibição da sua maturação sexual) (Robinson *et al*, 2003).

Da exposição do *Oryzias latipes* (*O. Latipes*) ao 17β -estradiol e de outras espécies de peixes a estrogénios ou a efluentes com características estrogénicas, verificou-se a diminuição do sucesso reprodutivo da população exposta (fecundidade, fertilidade, viabilidade embrionária e lavar). A exposição de machos *O. latipes* a $15 \mu\text{g L}^{-1}$ de estradiol conduziu ao aparecimento de um nº significativo de indivíduos com gónadas apresentando morfologia típica de intersexo – presença de oócitos imaturos nos testículos (Solé *et al*, 2002; Koger *et al*, 2000).

Em machos e fêmeas de *P. promelas* expostos durante 14 dias ao 17β -estradiol verificou-se uma relação dose/resposta positiva entre a exposição ao 17β -estradiol e a expressão do RNAm da P450 aromatase B ao nível das gónadas. Esta relação parece indicar a existência de um *feedback* positivo na expressão de RNAm do P450 aromatase B ao nível dos ovários e dos testículos, regulado pelo 17β -estradiol. O controlo dessa expressão ao nível dos testículos sugere um papel regulador daquele estrogénio na aromatização da testosterona (Halm, *et al.*, 2002).

Ao nível do cérebro dos machos expostos, verificou-se que, em doses baixas, o 17β -estradiol induziu a expressão de RNAm da P450 aromatase B, enquanto que a exposição a doses mais elevadas, resultou um efeito inibitório (*feedback* negativo). Os resultados obtidos ao nível das gónadas e cérebro sugerem que a regulação da expressão de RNAm da P450 aromatase B depende da isoforma da enzima, do tecido no qual é expressa e do estágio de desenvolvimento sexual do indivíduo exposto (Halm *et al*, 2002).

O estudo realizado sobre peixes de *P. promelas* expostos durante 14 dias a 17β -estradiol, em concentrações habitualmente encontradas no meio aquático, revelou que os indivíduos expostos não apresentaram qualquer diferença estatisticamente significativa relativamente a parâmetros como peso, comprimento ou no fator de condição (relação entre peso e comprimento de cada indivíduo), quer nos machos quer nas fêmeas amostradas. Contudo, alguns estudos indicam que a exposição a efluentes de ETARs (ou suas diluições) ou a estrogénios naturais ou sintéticos poderá afetar a sobrevivência, crescimento ou a condição global do indivíduo, devido não só ao(s) composto(s) (concentrações) a que está exposto, mas

também à fase do ciclo de vida e à própria sensibilidade da espécie. Por exemplo, indivíduos adultos de *D. rerio* não são afetados quanto ao crescimento e ao fator de condição, pela exposição a várias concentrações de etinilestradiol enquanto que, os juvenis expostos apresentaram menor peso e comprimento face aos controlos (Versonnen *et al.*, 2004). Neste tipo de estudos não poderão, por isso, ser esquecidas diferenças específicas da própria espécie, bem como diferenças quanto aos diferentes estádios de desenvolvimento em que o indivíduo é exposto (Park *et al.*, 2004).

É conhecida a diminuição da atividade do EROD em fêmeas maduras após exposição a estradiol, a etinilestradiol ou a outros xenostrogénios (Solé *et al.*, 2003). O mecanismo responsável pela inibição desta enzima pelos estrogénios não é ainda bem conhecido, dependendo a extensão da inibição não só dos níveis de estradiol circulante, mas também da espécie, sexo e estágio reprodutivo (balanço entre os níveis de estrogénios circulantes e exógenos) (Solé *et al.* 2002). Os efluentes de ETARs apresentam uma mistura complexa de compostos, alguns dos quais poderão ser potentes indutores do sistema das monooxigenases (como, por exemplo, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - PAH) e, deste modo, mascarar a inibição do EROD pelos xenostrogénios normalmente presentes em concentrações muito baixas (Solé *et al.*, 2002; Solé *et al.*, 2003).

Para avaliar os efeitos/influência de compostos estrogénicos na actividade de algumas enzimas de fase I de biotransformação, procedeu-se à avaliação da actividade da EROD em peixes de *O. mykiss* expostos *in vivo* (Robinson *et al.*, 2003) a efluentes de estações de tratamento de águas residuais (cuja toxicidade foi avaliada por testes com *Daphnia magna*) e em hepatócitos expostos *in vitro* a diluições daqueles efluentes. Todos os efluentes induziram nos peixes expostos o aumento da actividade da EROD associada, em alguns casos, ao aumento da concentração de proteína total hepática. O aumento da atividade desta monooxigenase, das vias de destoxificação hepática, associado ao aumento da proteína total, poderá constituir uma evidência da toxicidade do(s) efluente(s). Este aumento da toxicidade hepática poderá traduzir-se numa diminuição paradoxal na produção de vitelogenina em resposta à exposição a efluentes, cuja estrogenicidade foi previamente confirmada (Solé *et al.*, 2002; Nakari, 2004).

Em mexilhões expostos a efluentes provenientes de uma estação de tratamento de águas residuais, tal como aconteceu em outros estudos conduzidos sobre diferentes espécies de peixes, a mortalidade registada durante a exposição foi bastante baixa.

Contudo, relativamente à relação peso fresco dos tecidos/peso da concha registou-se uma diminuição significativa daquela relação nos mexilhões expostos (Quinn *et al.*, 2004).

Ao nível celular verificou-se que os mexilhões expostos ao efluente apresentavam indícios de extrema vacuolização intra-celular e aumento do lúmen dos túbulos da glândula digestiva. Apesar de neste estudo não se ter verificado qualquer tendência para um maior nº de indivíduos de um determinado sexo, verificou-se que as gónadas dos machos expostos apresentavam um aumento de tecido intersticial indiferenciado entre os túbulos seminíferos e continham, relativamente aos controlos, espermatogónias e espermátocitos em menor nº e menor desenvolvimento. O aumento do tecido intersticial indiferenciado nos túbulos seminíferos conduz a uma redução da área efetiva de produção de esperma. Os efeitos morfológicos observados nos machos expostos a efluentes ou a compostos estrogénicos, indicam uma redução na fecundidade daqueles indivíduos. Os mexilhões expostos apresentaram, relativamente aos controlos, níveis superiores de proteínas “vitellin-like” revelando algum tipo de desregulação hormonal (Quinn *et al.*, 2004).

Contudo, no estudo em que se procedeu à exposição de cócopodes *Tisbe battagliai* (*T. battagliai*) a 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol e à estrona durante 21 dias, não se verificou qualquer diferença, relativamente aos controlos, no que diz respeito à sobrevivência, desenvolvimento, relação nº fêmeas/nº machos e fecundidade nos indivíduos expostos. Estes resultados sugerem que os Crustáceos não são tão sensíveis aos estrogénios em níveis residuais como os peixes (Hutchinson *et al.*, 1999).

Como se pode verificar, pelo que atrás foi dito, é evidente a influência que os compostos estrogénicos, naturais ou sintéticos, poderão ter sobre os organismos aquáticos. A presença de determinados efeitos nesses organismos, prende-se não só com a concentração em que esses compostos se encontram no meio aquático, mas também com a sensibilidade da espécie e, sobretudo, com a fase do seu ciclo de vida. A exposição a este grupo de compostos em fases precoces do desenvolvimento do indivíduo poderá conduzir nos machos a uma alteração das duas gónadas, impossibilitando a produção de gâmetas viáveis, e nas fêmeas, alteração na sua homeostasia hormonal, a qual se poderá traduzir numa diminuição de fertilidade. Poderão ainda observar-se, alterações morfológicas nas suas gónadas com repercussão para a produção de oócitos viáveis. Por outro lado, poderá ainda ocorrer a reversão de sexo no sentido favorável às fêmeas.

Esta situação terá tanto mais impacto quanto mais precoce for a exposição do indivíduo, principalmente nas espécies que apresentam durante o seu ciclo de vida uma fase de hermafroditismo.

De realçar que atualmente se encontram identificadas algumas fontes dos estrogénios em estudo, além dos efluentes das ETARs, nomeadamente em alimentos como a carne, peixe, ovos, carne de porco e derivados de leite; em lamas das ETARs e em resíduos agrícolas (Birkett & Lester, 2003).

4.2- Determinação dos estrogénios alvo nas ETARS estudadas

4.2.1 – Procedimento experimental

Relativamente ao procedimento experimental, este foi efetuado segundo os objetivos propostos: o primeiro objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de um processo de extração em fase sólida para reconcentração dos estrogénios extraídos, e posterior análise por HPLC dos estrogénios em amostras de águas residuais. O segundo objetivo foi a quantificação dos estrogénios alvo, em nove ETARs, localizadas na Região Centro de Portugal, à entrada e saída das mesmas, antes de serem descarregadas nos rios.

4.2.2 – Preparação das amostras recolhidas nas ETARs

Foram recolhidas e analisadas amostras de efluentes de várias ETARs com tratamentos secundários, na região centro de Portugal, nomeadamente nas regiões do Baixo Vouga (Aveiro), Baixo Mondego (Coimbra) e Pinhal Litoral (Leiria). No distrito de Aveiro procedeu-se à recolha e análise de amostras da ETAR de Cacia (Aveiro), ETAR de Aguada de Cima (Águeda) e ETAR da Mealhada. No Concelho de Coimbra procedeu-se à recolha e análise de amostras da ETAR do Choupal (Coimbra), ETAR de Taveiro (Coimbra), ETAR de Ceira (Coimbra) e ETAR de Alagoa (Arganil). No Concelho de Leiria procedeu-se à recolha e análise de amostras da ETAR de Pombal e ETAR da Marinha Grande. Todas as amostras de água foram recolhidas três vezes, por períodos temporais diferentes (uma recolha por mês durante o ano de 2011), à entrada e saída de nove ETARs principais localizadas na Região Centro de Portugal, recebendo apenas águas domésticas.

Após a recolha das águas, todas as amostras foram filtradas através de um filtro de microfibras de vidro GF/F 55 MM da Whatman com a ajuda de uma bomba de vácuo, para eliminação dos sólidos em suspensão. Foi sucessivamente filtrada através de um filtro de fibra de vidro de 0,45 µm da Millipore, antes da sua extração em fase sólida. Após este procedimento, todas as amostras foram acidificadas a pH 2 e armazenadas a 4 °C ao abrigo da luz. O procedimento de SPE utilizado para as amostras foi sempre realizado 24 h após a recolha, para minimizar a possível atividade microbiana. Após o procedimento de SPE, o produto de eluição foi seco, recorrendo a uma bomba de vácuo, sendo o extrato redissolvido em 1 mL de acetonitrilo. Após esta reconcentração e antes da sua análise por HPLC, as amostras foram filtradas através de um filtro de membrana de 0,22 µm da Millipore.

4.2.3 – Análise das amostras à entrada e saída das ETARs

Todo o método de SPE-HPLC foi aplicado para a determinação dos estrogénios alvo à entrada e saída das nove ETARs em estudo. Os resultados encontram-se apresentados nas tabelas 14 e 15.

Na generalidade as concentrações dos estrogénios encontradas à entrada das ETARs estudadas, variaram em intervalos de 0,14-0,51 µg L⁻¹ para o estradiol, 0,13-0,23 µg L⁻¹ para o etinilestradiol e 0,16-0,72 µg L⁻¹ para a estrona. As concentrações dos estrogénios encontradas à saída das mesmas variaram em intervalos de 0,10-0,20 µg L⁻¹ para o estradiol, 0,11 a 0,19 µg L⁻¹ para o etinilestradiol e 0,15-0,25 µg L⁻¹ para a estrona. De salientar, que embora o estradiol apresentasse um pico em todos os cromatogramas, a área obtida resultou sempre num valor mais baixo que o LOD calculado na respetiva curva de calibração. De sublinhar ainda que por vezes ocorreram algumas dificuldades na utilização deste processo SPE-HPLC, nomeadamente na obtenção de resultados reprodutíveis para as baixas concentrações encontradas, mesmo para um número de réplicas igual a cinco.

Tabela 14 – Concentrações dos estrogénios alvo, expressas em $\mu\text{g L}^{-1}$ (n=3), à entrada e saída das nove ETARs estudadas (entre 3000 e 6000 habitantes), ano 2011

Concentração dos estrogénios ($\mu\text{g L}^{-1}$)	ETAR 1 Jan-Mar		ETAR 8 Jan-Mar		ETAR 9 Jun-Ago		ETAR 3 Fev-Abr		ETAR 6 Fev-Abr	
	Número de habitantes servidos por cada ETAR									
	3 000		3 000		3 145		5 000		6 000	
	Ent ^a	Sai ^b	Ent ^a	Sai ^b	Ent ^a	Sai ^b	Ent ^a	Sai ^b	Ent ^a	Sai ^b
E1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,23	0,16	0,16	0,15
DP	-	-	-	-	-	-	$\pm 0,02$	$\pm 0,01$	$\pm 0,04$	$\pm 0,02$
E2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,25	0,19
DP	-	-	-	-	-	-	-	-	$\pm 0,02$	$\pm 0,03$
E3	0,24	0,15	n.d.	0,15	n.d.	n.d.	0,25	n.d.	0,16	n.d.
DP	$\pm 0,01$	$\pm 0,02$	-	$\pm 0,02$	-	-	$\pm 0,03$	-	$\pm 0,04$	-
EE2	0,13	0,14	n.d.	0,14	n.d.	n.d.	0,16	n.d.	0,19	n.d.
DP	$\pm 0,01$	$\pm 0,03$	-	$\pm 0,03$	-	-	$\pm 0,02$	-	$\pm 0,02$	-

(a)- entrada da ETAR; (b)-saída da ETAR, DP= desvio padrão, n.d. = não detetado

Tabela 15– Concentrações dos estrogénios alvo, expressas em $\mu\text{g L}^{-1}$ (n=3), à entrada e saída das nove ETARs estudadas (entre 20 500 e 203 202 habitantes), ano 2011

Concentração dos estrogénios ($\mu\text{g L}^{-1}$)	ETAR 7 Jan-Mar		ETAR 5 Jan-Mar		ETAR 2 Jun-Ago		ETAR 4 Fev-Abr	
	Número de habitantes servidos por cada ETAR							
	20 500		50 000		180 000		203 202	
	Ent ^a	Sai ^b	Ent ^a	Sai ^b	Ent ^a	Sai ^b	Ent ^a	Sai ^b
E1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,72	0,25
DP	-	-	-	-	-	-	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$
E2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,14	0,10
DP	-	-	-	-	-	-	$\pm 0,03$	$\pm 0,01$
E3	0,15	n.d.	0,14	n.d.	0,24	0,12	n.d.	n.d.
DP	$\pm 0,02$	-	$\pm 0,01$	-	0,02	0,02	-	-
EE2	0,14	n.d.	0,18	n.d.	0,15	0,12	0,14	n.d.
DP	$\pm 0,03$	-	$\pm 0,02$	-	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$	$\pm 0,06$	-

(a)- entrada da ETAR; (b)-saída da ETAR, DP= desvio padrão , n.d. = não detetado. Nota – as concentrações do E3 determinadas estão abaixo do LD pelo que deverão ser lidas como indicativas somente da presença desta hormona.

4.2.4 – Resultados e discussão

Os estrogénios mais frequentemente detetados à entrada de todas as ETARs estudadas foram o E3 (abaixo do LOD) e EE2 (Graf. 5), mas à saída a concentração mais elevada encontrada foi a de E1 (Graf. 3). Todos os estrogénios naturais e sintéticos, foram detetados à entrada das ETARs que servem um número de habitantes entre 5 000 e 203 202. A sua presença à entrada destas ETARs, pode ser explicada como sendo consequência natural da excreção humana.

A presença de EE2 (Graf. 6) nos efluentes é de particular interesse uma vez que há estudos que mencionam a sua toxicidade a baixas concentrações e na ordem dos nanogramas por litro (Johnson & Sumpter, 2001). O E1 e E2 (Graf. 3 e 4) são os estrogénios mais frequentemente encontrados à saída das ETARs estudadas, particularmente nas que servem maior número de habitantes.

Assim, a ocorrência de E1, E2 e EE2 à saída das ETARs, poderá ser o resultado de uma remoção incompleta destes compostos durante o tratamento, ou a libertação de formas conjugadas ativas destas hormonas, durante o processo de tratamento (Alda & Barceló, 2001; Johnson *et al*, 2000).

Gráfico 3 - Gráficos da estrona vs entradas e saídas das diferentes ETARs estudadas (n=3).

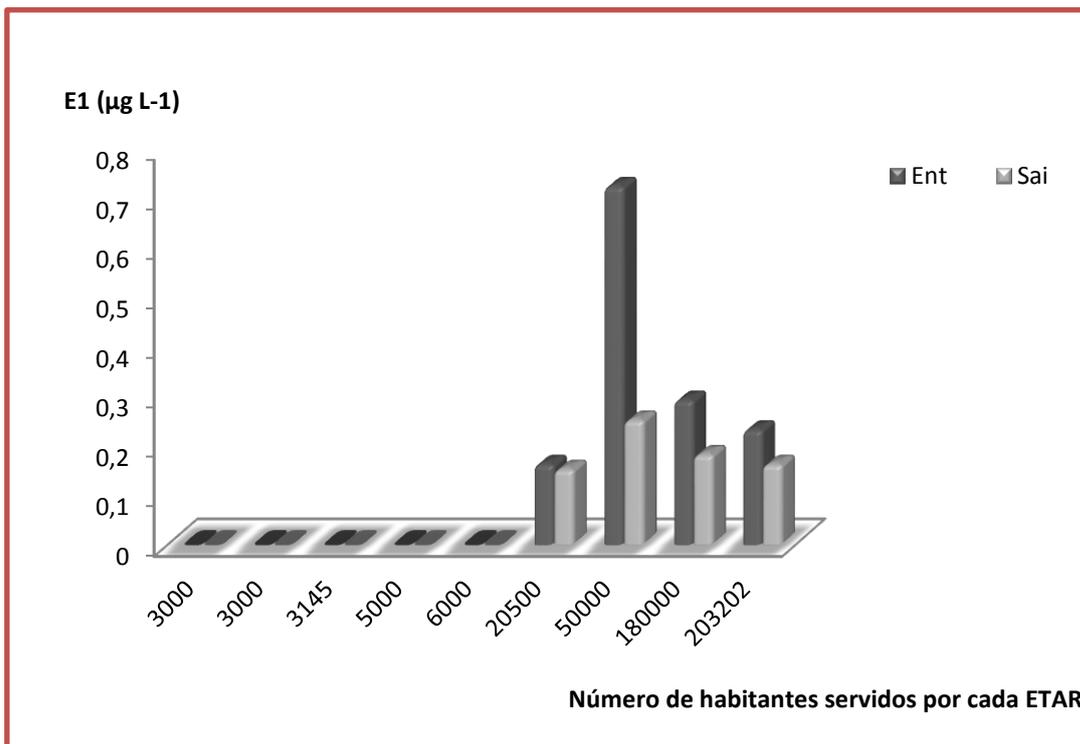


Gráfico 4 - Gráficos do estradiol vs entradas e saídas das diferentes ETARs estudadas (n=3).

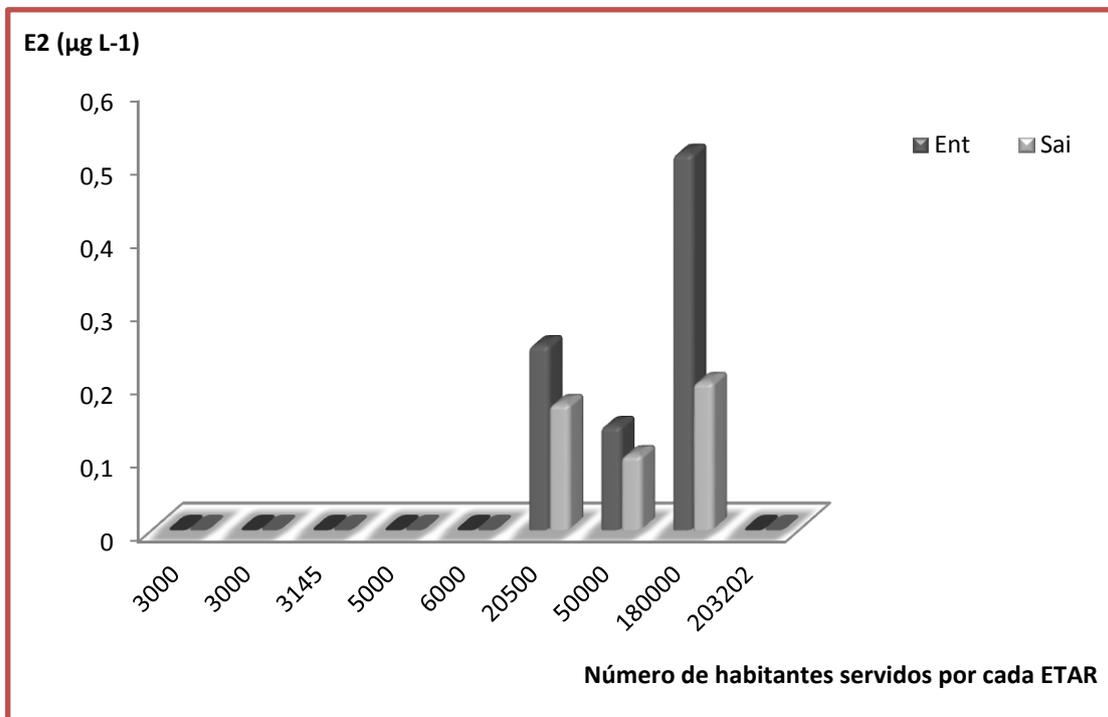
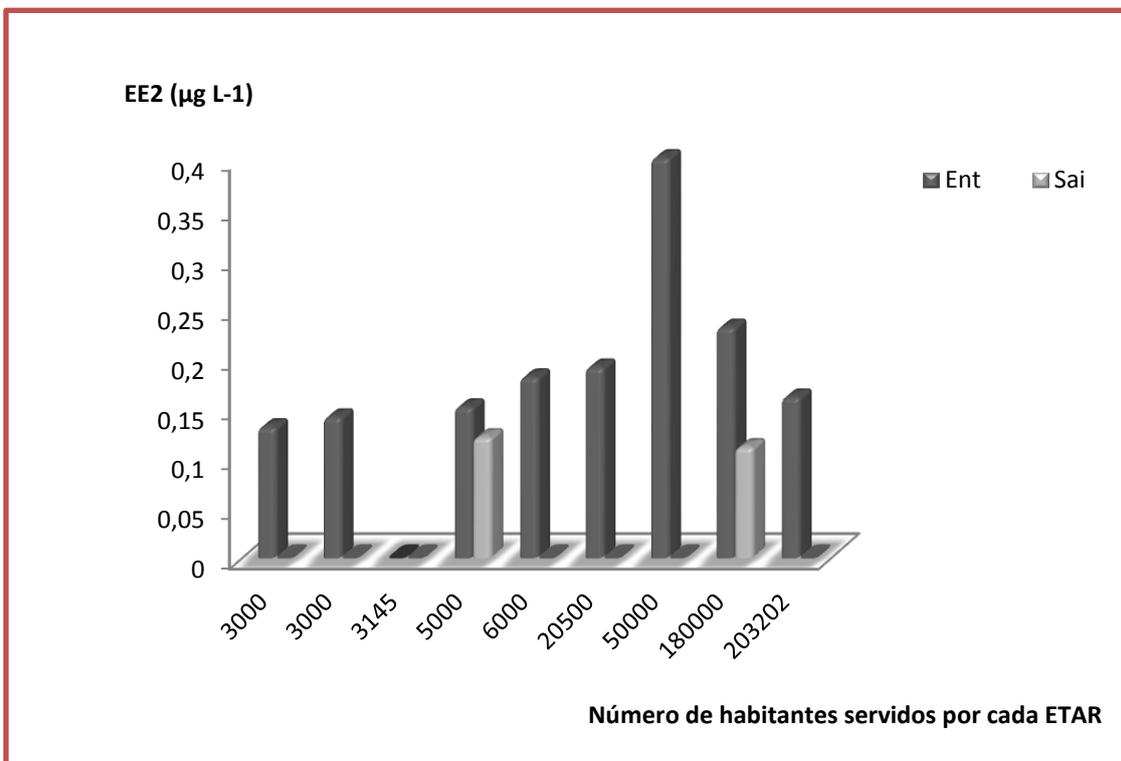


Gráfico 5 - Gráficos do etinilestradiol vs entradas e saídas das diferentes ETARs estudadas (n=3).



4.3 – Conclusão

As ETARs, por norma, não são concebidas para ter em atenção o tratamento de contaminantes orgânicos, o aparecimento de compostos emergentes, na forma de sub-produtos e seus metabolitos, que persistem após o tratamento das águas residuais, entrando desta forma no ambiente aquático, e posteriormente nas estações de tratamento de água (ETAs) que servem os habitantes. Os três estrogénios naturais, bem como o estrogénio sintético têm sido frequentemente detetadas em descargas de ETARs, devido à sua incompleta remoção durante o tratamento das águas residuais (Yan *et al*, 2009; Sarmah *et al*, 2006; Vulliet *et al*, 2007; Laganá *et al*, 2004).

Neste estudo, foi efetuada uma otimização dos métodos analíticos com base num procedimento experimental SPE-HPLC com deteção UV, para a determinação simultânea dos quatro estrogénios alvo em amostras de água residuais.

Inicialmente cinco métodos diferentes de SPE (descritos no capítulo III) foram testados, com padrões, para a otimização do procedimento a aplicar na quantificação dos estrogénios alvo em amostras reais. Para o método escolhido, efetuaram-se testes de recuperação para cada estrogénio, com resultados muito bons que variam entre 100-120% para a E1, 85 a 110% para o E2, 90 a 120% para o EE2 e 89,8 a 110% para o E3.

Estes resultados confirmaram que o método SPE-HPLC utilizado foi considerado adequado para a aplicação em amostras de águas residuais das diferentes ETARS escolhidas, tendo sido utilizado o mesmo procedimento experimental, em todas as determinações das concentrações dos quatro estrogénios na entrada e saída das mesmas.

Todos os compostos que foram escolhidos para este estudo foram detetados nos afluentes e efluentes das nove ETARS, com concentrações na casa dos nanogramas por litro, indicando uma permanente entrada nos rios, após o tratamento destas águas residuais.

Na generalidade, as concentrações dos estrogénios encontradas à entrada das ETARS estudadas, variaram em intervalos de 0,14-0,51 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o estradiol, 0,13-0,23 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o etinilestradiol e 0,16-0,72 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a estrona. As concentrações dos estrogénios encontradas

à saída das mesmas variaram em intervalos de 0,10-0,20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o estradiol, 0,11 a 0,19 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o etinilestradiol e 0,15-0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a estrona.

As quantidades que eventualmente possam ser ingeridas potenciam a hipótese de bioacumulação nos organismos aquáticos e respetivos efeitos ambientais destes compostos, aparentemente estáveis e biologicamente ativos. Relativamente a este estrogénio, uma possível contribuição para as concentrações de etinilestradiol observadas poderá surgir da parcial conversão de outros princípios ativos constituintes dos contraceptivos orais (ex. noretisterona) e/ou tratamentos hormonais (Solé *et al.*, 2002).

Estes resultados são semelhantes quando comparados aos valores obtidos em estudos efetuados em outros países, como a Alemanha, Itália e Holanda (Jonhson *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2008; Streck, 2009).

Os resultados mostram ainda que os estrogénios pesquisados, podem ser simultaneamente separados e, posteriormente, quantificados usando o método escolhido, em amostras de águas residuais, com uma precisão bastante satisfatória.

Capítulo V – Estudo da degradação dos estrogénios

5.1 – Introdução

A degradação de alguns micropuluentes (Ternes et al., 1999; Tusnelda et al., 2003) no ambiente tem sido alvo de vários estudos, já que estes persistem no ambiente, prova disso são os resultados obtidos no capítulo anterior desta dissertação de tese, onde se pode verificar a persistência de E1, E2 e EE2 nos locais de amostragem à saída das ETARs estudadas.

Estes resultados, aliada à complexidade das matrizes das águas residuais e à resistência destes compostos à degradação natural e sua remoção efetiva durante o tratamento das águas residuais, torna-se essencial a avaliação da fotodegradação e termoestabilidade, como uma ferramenta para determinar níveis de poluição, sob várias condições.

Assim, e em função do que anteriormente foi referido, o objetivo deste estudo foi avaliar a degradação dos quatro estrogénios alvo, sob a influência da radiação solar natural direta e ainda a termoestabilidade destes a uma gama de diferentes temperaturas e ao abrigo da luz.

5.2 – Procedimento experimental

5.2.1. Instrumentação

Todas as medições UV foram realizadas utilizando um Espectrofotómetro Shimadzu UV-1603, e células de quartzo com um percurso ótico de 1 cm.

Todas as análises de eletroforese capilar foram efetuadas, utilizando um sistema Beckman P/ACE MDQ equipado com um detetor de matriz de díodos. As separações electroforéticas foram realizadas utilizando um capilar de sílica fundida não revestido, com comprimento total de 50 cm (40 cm de comprimento até á janela ótica), diâmetro interno de 50 µm e diâmetro externo de 375 µm .

5.2.2. Preparação das amostras para medição UV e análise por eletroforese capilar

Todas as amostras e tampão foram preparadas como descrito nos pontos 3.2.2.2 e 3.4.3.1. do capítulo III, bem como as condições de separação utilizadas na eletroforese capilar descritas no ponto 3.4.3.1. do mesmo capítulo.

5.3 – Resultados e discussão

5.3.1 – Análise da degradação por espectroscopia UV-Visível

O traçado do espectro individual de cada estrogénio por UV-Vis foi efetuada antes da sua análise por EC, e assim verificar a respetiva degradação ao fim de 7, 14, 21, 28, 35, 63, 91 e 126 dias. O efeito da temperatura foi avaliado em condições de 4º C (frigorífico), 20º C (temperatura ambiente) e 30º C (banho-maria), bem como ao abrigo da luz. Para estudar o efeito da irradiância solar direta foram utilizados tubos de quartzo com as soluções amostra e expostas diretamente à radiação (GPS 40ºN 11.885; 8ºW 27.650) durante os 126 dias de estudo. O valor de irradiância média foi de 5,4 KWh/m²/dia (Huld e Suri), representado na figura 23.

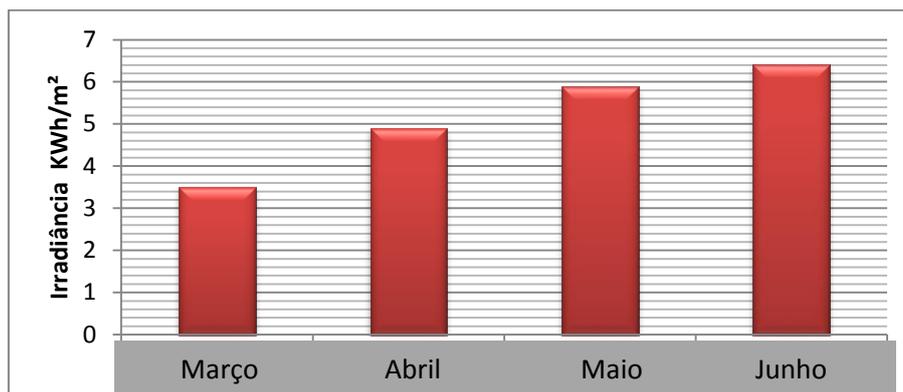


Figura 23 – Valores da irradiância média de cada mês durante o estudo experimental

Os espectros das diferentes amostras foram todos obtidos entre o intervalo 210 e 300 nm. Os quatro estrogénios mostraram espectros de UV-Vis muito similares apresentando dois picos: um primeiro ao comprimento de onda de 226 nm e um segundo ao comprimento de onda de 281 nm.

Durante todo o estudo experimental, não se observaram alterações significativas nos espectros das amostras que se encontravam ao abrigo da luz e que se encontravam nas condições de temperatura de 4º, 20º e 30ºC. Contudo, verificou-se fotodegradação nas amostras que estiveram expostas à radiação solar ao longo dos 126 dias, como nos mostra a figura 24. Comparando as formas dos espectros no dia 0 (início) e no dia 126 (fim), podem-se observar alterações significativas, indicando degradação dos compostos estudados.

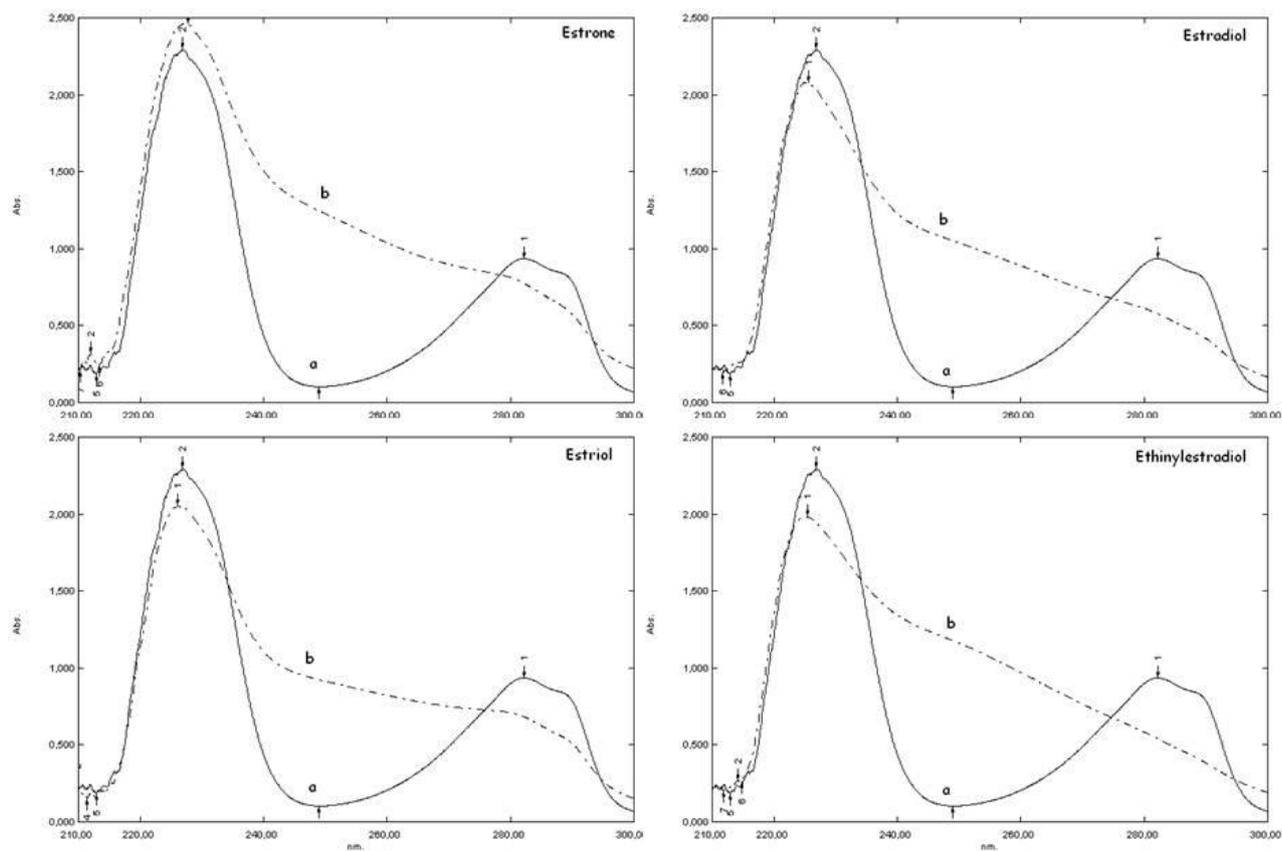


Figura 24 - Sobreposição dos espectros, de cada estrogénio, sobre condições de radiação solar directa
(a) - 0 dias (b) – depois de 126 dias

5.3.2 Análise da degradação por electroforese capilar de zona

5.3.2.1 - Estudo da degradação

Através da análise dos electroferogramas (Fig. 25), pode verificar-se a diminuição das áreas do pico correspondentes a cada estrogénio, ao mesmo tempo que outros picos foram surgindo (assinalados a vermelho), resultantes da degradação dos estrogénios e formação de fotoprodutos.

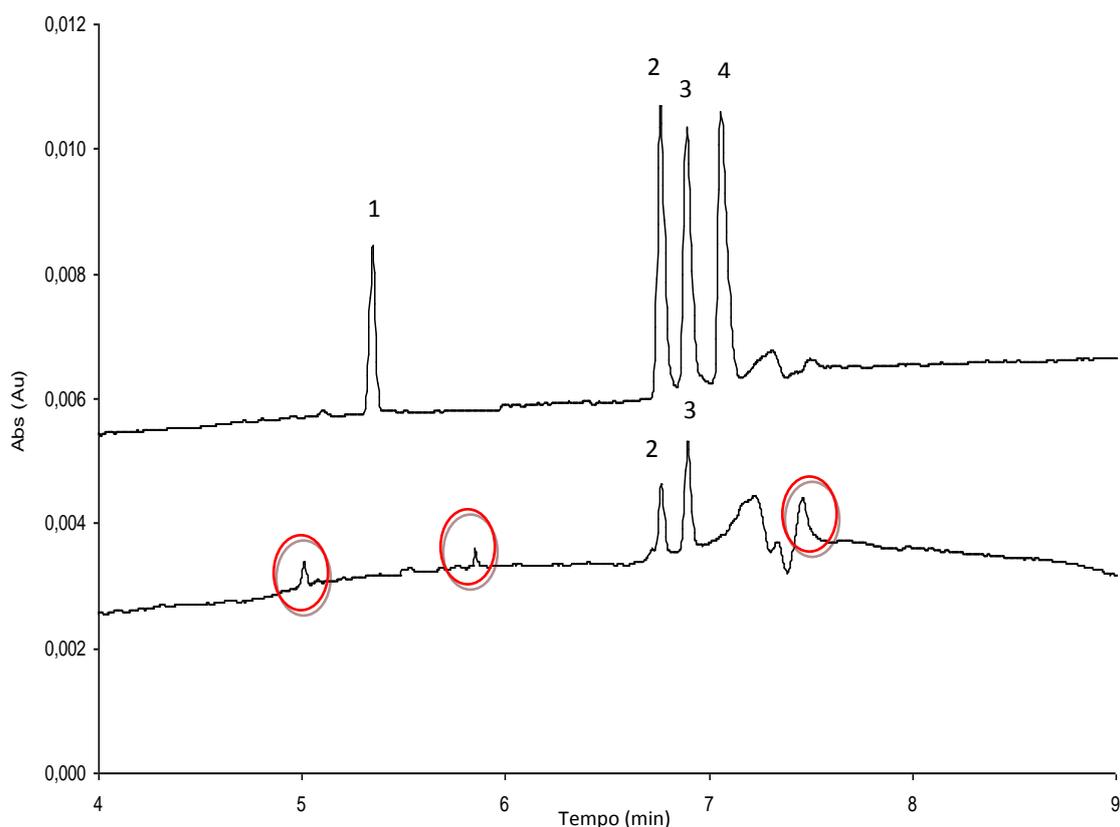


Figura 25 –Electroferograma da amostra ao tempo zero (a); depois de 126 dias sob efeito direto da radiação solar (b). Identificação de cada pico: (1) - E3 ; (2)- E2 ; (3) -EE2 (4) E1 – Estrona; ○ picos não identificados (subprodutos?)

Analisando a figura 26, é possível observar que não existe degradação significativa para nenhum dos estrogénios estudados, às temperaturas de 4º, 20º e 30º C e ao abrigo da luz. Por outro lado, sob o efeito da radiação solar direta, a estrona apresenta 100% de degradação após 120 dias de estudo. De todos os estrogénios alvo deste estudo, o EE2 parece ser o estrogénio mais persistente de todos, com cerca de 20% da concentração inicial, após 120 dias de estudo. O estriol apresentou a maior taxa de degradação no início do estudo, apresentando

50% de degradação após 40 dias. Para a estrona apresentar 50% de degradação foram necessários 55 dias, enquanto para o E2 foram 60 dias e para o EE2 75 dias. De salientar ainda, que a taxa de degradação do estriol tornou-se muito lenta após 80 dias de estudo. Pelos resultados obtidos neste estudo, relativamente à degradação destes compostos sob várias condições, é evidente e claro o efeito positivo da radiação solar direta na degradação e eliminação destes disruptores endócrinos, mesmo em concentrações tão elevadas como as que foram utilizadas neste estudo. Portanto, a luz solar direta nas estações de tratamento de águas residuais, pode aumentar a remoção de alguns destes disruptores, através do processo de fotodegradação.

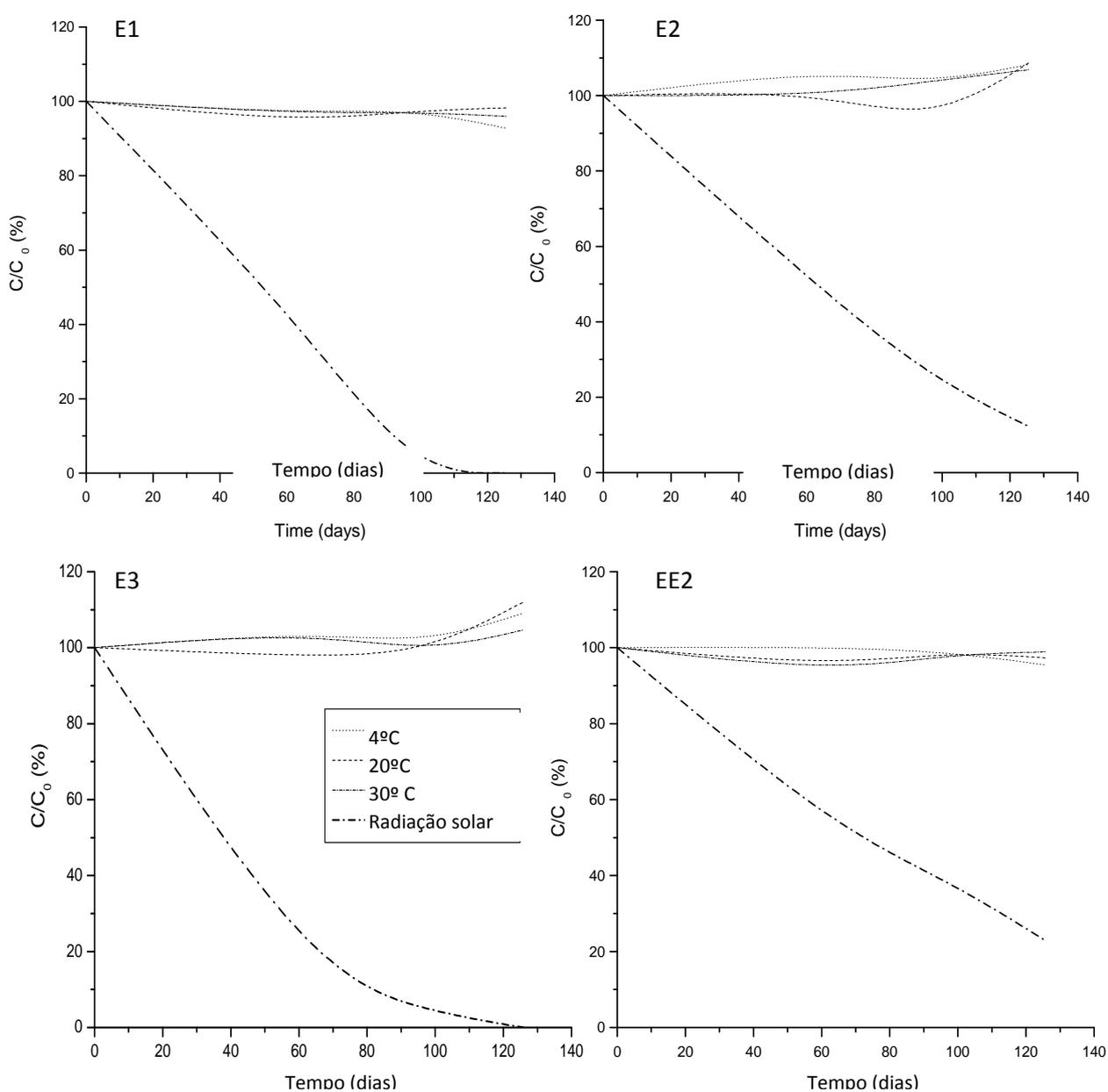


Figura 26 – Variação da concentração(%) de cada estrogénio, em função do tempo.

5.4 - Conclusão

O presente estudo demonstrou que o E1, E2, E3 e EE2 no intervalo de temperaturas de 4°C e 30°C, ao abrigo da luz, não sofrem degradação detetável com os métodos analíticos utilizados neste trabalho. No entanto, sob radiação solar direta observou-se uma mudança nas formas dos espectros obtidos, após 126 dias, para todos os estrogénios estudados. A análise feita por electroforese capilar mostrou que sob a radiação solar direta, a estrona apresentou 100% de degradação após 126 dias. O EE2 foi o único que pareceu ser mais persistente e o E3 foi o que apresentou uma taxa de degradação inicial mais rápida.

Outra observação que poderá ser feita, através da análise dos electroferogramas, é o aparecimento de vários picos correspondendo à formação de sub-produtos derivados da degradação dos estrogénios. Este estudo demonstra que E1, E2, E3 e EE2 podem ser degradados por radiação solar natural e direta, no entanto, outras condições ambientais, tais como: presença de matéria orgânica natural, atividade biológica e variação do teor de oxigénio, devem ser estudadas de modo a poder tirar conclusões mais próximas das que se tirariam tendo em atenção as condições naturais (Fonseca *et al.*, 2010).

Capítulo VI – Uso de Radioimunoensaio na determinação de estrogénios em anfíbios nos efluentes das ETARs

6 – Introdução

Todos os compostos químicos potencialmente capazes de alterar o normal funcionamento do sistema endócrino, bem como o estado fisiológico dos animais, têm-se revelado uma crescente fonte de preocupação. Os relatos de aumento do número de casos de cancro hormono-dependentes e a diminuição da quantidade e qualidade dos gâmetas sexuais nos humanos conduziram a questões sobre o papel desses compostos nestes problemas de saúde (Kolpin, et al., 2002). Logo após a inserção dos compostos químicos no meio ambiente, tornou-se evidente a ligação da contaminação ambiental dos rios e lagos com uma grande variedade de anomalias no crescimento e reprodução em algumas espécies. Como já foi referido no capítulo V desta dissertação, existem evidências de que uma grande variedade de compostos químicos, com origem antropogénica, que apresentam propriedades e mecanismos de ação semelhantes a hormonas endógenas. Assim, os estrogénios em “concentrações ambientalmente relevantes” são suscetíveis de causar anomalias morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e comportamentais em vertebrados e invertebrados (Markey *et al*, 2001).

Algumas das formas de investigação destas hormonas no ambiente consiste na medição de concentrações nos efluentes, testes de toxicidade dos efluentes nos animais e a avaliação dos efeitos nas comunidades de plantas e animais. As determinações de concentrações diretas são necessárias, mas não permitem a obtenção de uma evolução histórica completa.

O fator de risco biológico, muito dificilmente, consegue ser avaliado por este tipo de metodologia e uma das principais razões para o controlo da poluição são os seus efeitos biológicos. Durante a última metade do século passado os invertebrados e os peixes desempenharam, por isso, um papel de relevância crescente nas técnicas de monitorização do meio ambiente.

Estudos de monitorização de disruptores endócrinos têm maioritariamente selecionado os peixes machos como bioindicadores. A maioria dos seus biomarcadores moleculares tem mostrado ser menos biologicamente dependentes e mais relacionados com a exposição aos contaminantes. Assim a estrogenicidade tem sido avaliada pela presença da vitelogenina (VTG), uma proteína específica das fêmeas maduras, em peixes machos ou juvenis. No entanto, uma quantidade anormal de VTG em fêmeas e a modificação do equilíbrio das hormonas sexuais tem sido apontada como um biomarcador complementar e fiável de potenciais distúrbios reprodutivos (Solé *et al.*, 2003). Em fêmeas de várias espécies de peixes, o estradiol ovárico controla diretamente a síntese de vitelogenina a nível hepático, como relataram alguns investigadores (Orn *et al.*, 2003; Solé *et al.*, 2002; Solé *et al.*, 2003; Larsson *et al.*, 1999; Versonnen & Janssen, 2004; Nakari, 2004; Robinson *et al.*, 2002; Halm *et al.*, 2002). A vitelogenina é transportada através da corrente sanguínea até aos oócitos onde é incorporada na forma de lipovitelina e fosvitina, as quais constituem as fontes nutricionais durante o desenvolvimento embrionário (Solé *et al.*, 2003; Versonnen & Janssen, 2004). Assim, todos os xenobióticos que interfiram com o metabolismo de esteróides poderão condicionar a síntese de estradiol e, deste modo, diminuir a síntese de vitelogenina e o armazenamento de nutrientes, condicionando a viabilidade dos ovos e colocando em risco o sucesso da postura. Por outro lado, uma excessiva estimulação para a síntese de vitelogenina poderá colocar em risco a síntese de outras proteínas vitais por sobrecarga dos sistemas metabólicos (Ternes *et al.*, 1999).

A crescente necessidade em conhecer os potenciais impactos da ação de compostos disruptores endócrinos em seres aquáticos, nomeadamente em peixes, conduziu a uma urgente busca de ensaios fiáveis para a avaliação do efeito de um determinado composto, isoladamente, bem como em misturas complexas, como é o caso dos efluentes domésticos e industriais (Orn *et al.*, 2003).

Existem vários estudos que evidenciam algumas das respostas biológicas em vertebrados aquáticos face à exposição a disruptores endócrinos, no entanto, e apesar da sua óbvia importância ecológica, poucos são ainda os estudos conduzidos em invertebrados (Hutchinson *et al*, 1999; Quinn *et al*, 2004).

Apesar de ser conhecido o efeito estrogénico de muitos compostos químicos, residem dúvidas sobre se as concentrações em que eles se encontram no meio ambiente são suficientes para causar efeitos fisiológicos adversos nos indivíduos ou nas populações expostas.

Na investigação de compostos estrogénicos presentes em efluentes de ETARs e seus potenciais efeitos em indivíduos de várias espécies a eles expostos, verificou-se que a fração com maior atividade estrogénica (identificada pelo bio-ensaio através de uma levedura que expressa o recetor de estrogénios humanos) co-eluiu com o padrão do 17α -etinilestradiol, 17β -estradiol e estrona. Estes resultados sugerem que poderão ser os estrogénios os responsáveis pela atividade estrogénica observada para os efluentes resultantes de ETARs domésticas (Ying *et al*, 2002; Larsson *et al*, 1999; Quinn *et al*, 2004).

Com o intuito de avaliar o risco da exposição são inúmeros os estudos desenvolvidos nesta área, sendo que a maior parte da investigação tem sido realizada em laboratório e em campo, principalmente em diversas espécies de peixes, répteis, pássaros e mamíferos (Harrison *et al*, 1997). Por este motivo, faz também parte integrante deste trabalho de investigação, o estudo de processos cumulativos de estrogénios em anfíbios. Estes animais têm pele permeável, vivem na água e no solo, e, devido à sua fisiologia e seu ciclo de vida, são expostos a determinadas variações ambientais, sendo particularmente sensíveis à poluição química dos sistemas aquáticos, uma das causas apontadas para a crescente extinção destes animais verificada hoje em dia, além das alterações climáticas atualmente observadas.

De realçar que têm vindo a sere identificados vários compostos químicos com intervenção nociva nas populações de anfíbios, alguns dos quais possivelmente associados ao declínio global deste grupo. Foi igualmente objetivo deste trabalho, identificar a presença dos estrogénios nos anfíbios (machos), em seu próprio habitat, em vida livre, e assim contribuir com informação útil para a conservação destas espécies de vertebrados.

6.1. Procedimento experimental

6.1.1 – Metodologia Analítica

Os métodos radioimunoensaios têm sido utilizados para a determinação de estrogénios e vitelogenina no sangue de modelos experimentais (Larsson, et al., 1999). As reatividades cruzadas dos anticorpos policlonais para a análise de estradiol e etinilestradiol com outras hormonas são atualmente inferiores a 1% e as medições de absorvância a 450 e a 630 nm permitem obter limites de deteção da ordem dos $0,1 \text{ ng L}^{-1}$ (Alda & Barceló, 2001). O método RIA está entre as técnicas analíticas mais sensíveis, de simples execução e rapidez, mas o seu uso encontra-se limitado pelo número reduzido de anti-corpos específicos disponíveis e, devido à possibilidade de ocorrerem reações cruzadas, com outros compostos ou hormonas.

6.1.2- Plano de amostragem

Tendo em conta os resultados obtidos no Capítulo IV desta dissertação, as áreas de amostragem foram localizadas junto às saídas das ETARs de Coimbra, Mealhada, Aveiro e Pombal, que servem maior número de habitantes, e respetivos locais de controlo, situados fora da área de influência das Estações de Tratamento.

6.1.3- Locais de amostragem

Foram escolhidos seis locais para o estudo, em quatro pontos da Região Centro de Portugal, dois grupos de controlo e quatro grupos-alvo em rios (efluentes das ETARs acima referidas). Os quatro grupos-alvo estão localizados no rio Mondego (Grupo I), com as coordenadas GPS $40^\circ \text{ N } 11,885$; $8^\circ \text{ W } 27,650$, Rio Vouga (Grupo II) com as coordenadas GPS $40^\circ \text{ N } 11,885$; $8^\circ \text{ W } 27,650$, Rio Cértima (Grupo III) com as coordenadas GPS ($40^\circ \text{ N } 11,885$, $27,650^\circ \text{ W } 8^\circ$) e Rio Arunca (Grupo IV) com as coordenadas GPS ($39^\circ \text{ N } 56,062$, $8^\circ \text{ W } 38,202$). Estes quatro locais situam-se nas saídas das ETARs, onde as águas residuais depois de tratadas são lançadas nos respetivos rios.

Os dois grupos de controlo (Grupo Controle I e Grupo de Controle II) localizados em Coimbra, um numa fonte doméstica e outro numa fonte municipal, com as coordenadas GPS 40 ° N 11,885; 8 W ° 27,650 e 40 ° N 11,885; 8 W ° 27,650, respetivamente, onde havia a certeza que as águas não tinham qualquer razão para conterem quaisquer tipos de contaminantes e, os indivíduos não estiveram expostos a concentrações elevadas dos compostos em estudo.

6.1.4.- Amostragem

Para o estudo em causa, recolheram-se amostras de sangue de indivíduos de rã-verde *Rana/Pelophylax perezi*. Tratando-se de uma espécie protegida por convenções internacionais (Convenção de Berna) e legislação nacional e comunitárias específicas (Anexo V da “Directiva Habitats” Decreto-Lei 140/99 de 24 de Abril, retificado pela Declaração de Retificação n.º 10-AH/99, de 31 de Maio, alterado pelo Decreto-Lei n.º 49/2005, de 24 de Fevereiro, que o republica), solicitou-se ao Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade (ICNB), uma licença para captura, detenção temporária e recolha de material biológico dos indivíduos. De salientar, que foi complicado a captura destes indivíduos, já que estes não abundavam nos locais de amostragem escolhidos. A detenção foi restrita ao tempo necessário para a manipulação dos indivíduos com vista à obtenção de uma amostra de material biológico (sangue) *in situ*. A captura dos indivíduos foi efetuada recorrendo a redes de mão do tipo “camareiro” (dip-nets), sendo, posteriormente, anestesiadas usando clorofórmio embebido em algodão (Fig. 27).



Figura 27 - Captura das rãs *Rana/Pelophylax perezii* e sua imobilização

Na colheita de sangue dos indivíduos anestesiados, utilizaram-se seringas hipodérmicas (uma por indivíduo, para não ocorrer qualquer tipo de contaminação) para extrair cerca de 1 mL de sangue de cada indivíduo (Fig. 28).



Figura 28 - Colheita de material biológico (sangue) das rãs *Rana/Pelophylax perezi*

Após a obtenção de cada amostra biológica, os indivíduos capturados foram todos libertados no respetivo local de captura, não apresentando qualquer tipo de limitação.

6.1.5. Preparação das amostras

Após a recolha de sangue de cada indivíduo, este foi transferido para um tubo, para colheita de soro, com gel de separação e ativador de coágulos, sendo imediatamente acondicionado numa arca frigorífica a 4°C. Posteriormente, foram transportadas até ao laboratório, para se efetuar os respetivos processamentos. Todas as amostras de sangue foram centrifugadas a 5000 g usando uma centrífuga refrigerada da marca JP Selecta, à temperatura de 4 °C, durante 10 min, para total separação da fração de soro. O soro foi então retirado para eppendorfs de 1 mL e armazenados numa arca frigorífica à temperatura de -20 °C, antes da medição dos estrogénios por RIA.

6.2. Resultados e discussão

6.2.1. Quantificação dos estrogénios nas amostras de soro

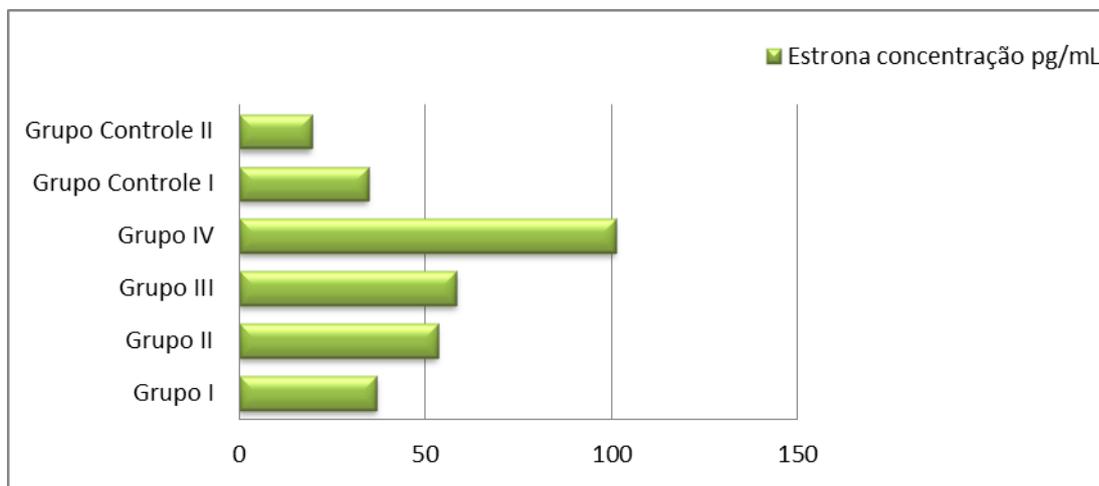
Os níveis dos estrogénios foram quantificados em cada amostra, em triplicado, após o procedimento experimental descrito nos próprios KITS de estradiol (volume de 200 µL) e estrona (volume de 100 µL) e no ponto 3.5.2.2. do capítulo III desta dissertação. Após a leitura do sinal (contagens por minuto) de cada amostra, converteram-se os valores para pg mL⁻¹, conforme os dados que constam da tabela 16.

Tabela 16 - Caracterização e resultados das concentrações de estrogénios nos indivíduos rã-verde *Rana/Pelophylax perezi*

	Nº de indivíduos	Genero	Estrona média cpm	Estrona média pg/mL	Estradiol média cpm	Estradiol média pg/mL
Grupo I	4	♂	10258,9	36,75	2595,6	149,431
Grupo II	4	♂	9104,6	53,31	4091,65	37,221
Grupo III	4	♂	8819,4	58,16	2834,05	118,103
Grupo IV	4	♂	6972,35	100,98	4513,3	25,312
Grupo Controle I	4	♂	10439,6	34,52	7553,1	0,0370
Grupo Controle II	4	♂	11869,5	19,34	3963,15	41,798

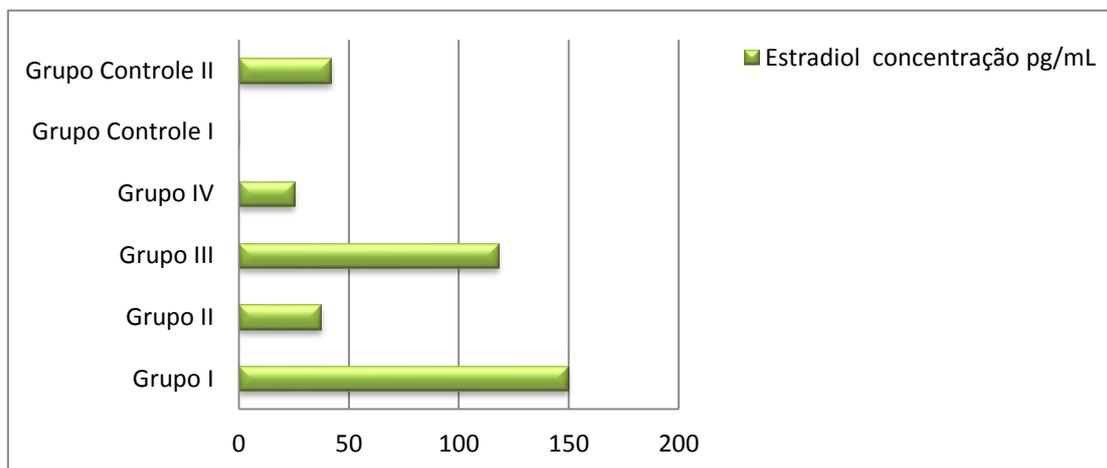
Analisando os valores das concentrações de estrogénios encontradas nos 24 indivíduos estudados, verifica-se que, os níveis de concentração de estradiol registados são mais elevados que os observados para a estrona, nos grupos experimentais I, III e no grupo de controlo II. O inverso sucede nos grupos experimentais II, IV e grupo de controlo I (Graf. 7 e 8).

Gráfico 5 - Concentrações de estrona nos indivíduos rã-verde *Rana/Pelophylax perezi*



Estrona	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo Controle I	Grupo Controle II
Conc pg/mL	36.8	53.3	58.2	101.0	35	19
DP	0.2	1	0.8	0.9	2	1

Gráfico 6 - Concentrações de estradiol nos indivíduos rã-verde *Rana/Pelophylax perezi*



Estradiol	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo Controle I	Grupo Controle II
Conc pg/mL	149	37,2	118,1	25,310	0,04	41,8
DP	1	0,2	0,1	0,003	0,02	0,9

6.2.2. Tratamento dos dados

Como na literatura não foram encontrados trabalhos em que a amostra fosse similar, procedeu-se à comparação dos resultados obtidos, entre os grupos experimentais e o grupo de controlo I e controle II, recorrendo-se ao teste de Kruskal Wallis. A posterior comparação entre pares de grupos (Tab. 17) foi realizada com o teste U de Mann-Whitney. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Para a análise estatística foi utilizado o *Statistical Package for the Social Sciences*, versão Windows (SPSS 18.0).

Tabela 17 – Comparação entre os pares de grupos e o grupo de controlo I

	Estradiol (pg/ml)				Estrona (pg/ml)			
	n	Média	Desvio-padrão	p ¹	n	Média	Desvio-padrão	p ¹
Grupo I	4	149	1		4	36,8	0,2	
Grupo II	4	37,2	0,2		4	53	1	
Grupo III	4	118,1	0,1	0,001	4	58,2	0,8	0,001
Grupo IV	4	25,310	0,003		4	101,0	0,9	
Grupo de controlo I	4	0,04	0,02		4	35	2	

¹ Kruskal Wallis Test

Para o estradiol existe um predomínio de valores mais elevados nos grupos experimentais face ao grupo de controlo I, com diferenças estatisticamente significativas ($p=0,001$). Nas comparações entre pares de grupos, envolvendo cada um dos grupos experimentais e o grupo de controlo I as diferenças de valores mantêm-se significativas qualquer que seja o par comparado ($p < 0,05$).

Na estrona a significância estatística permanece para a comparação entre os diversos grupos envolvidos (Tab. 18), igualmente com valores mais elevados para os grupos experimentais. Uma posterior comparação entre pares de grupos revela que tais diferenças são significativas quando em causa os grupos experimentais II a IV e o grupo de controlo I ($p < 0,05$). No par experimental I/controlo I o p observado foi não significativo.

Tabela 18 - Comparação entre os pares de grupos e o grupo de controlo II

	Estradiol (pg/ml)				Estrona (pg/ml)			
	n	Média	Desvio-padrão	p ¹	n	Média	Desvio-padrão	p ¹
Grupo I	4	149	1		4	36,8	0,2	
Grupo II	4	37,2	0,2		4	53	1	
Grupo III	4	118,1	0,1	0,001	4	58,2	0,8	0,001
Grupo IV	4	25,310	0,003		4	101,0	0,9	
Grupo de controlo II	4	41,8	0,9		4	19	1	

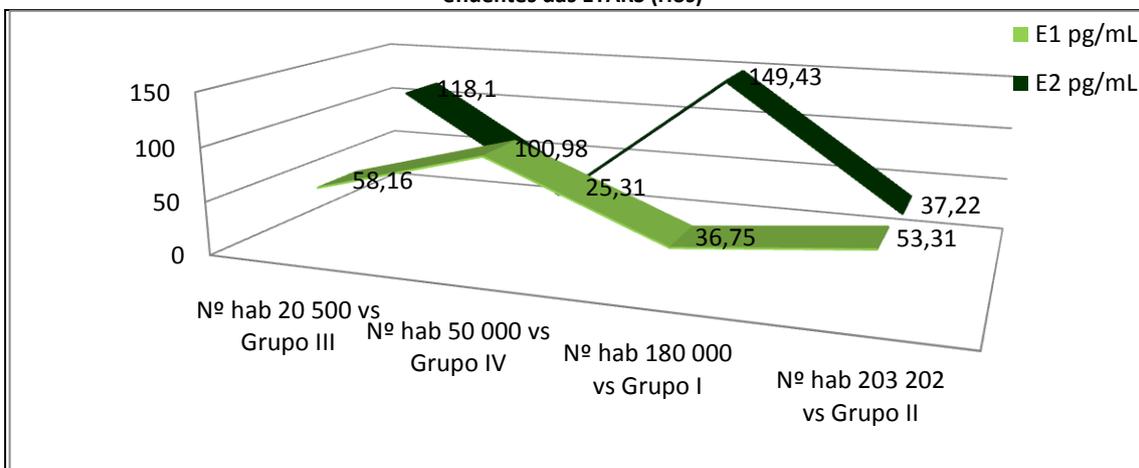
¹ Kruskal Wallis Test

No estradiol, quando o grupo de controlo utilizado é o II, nem sempre o predomínio de valores mais elevado se observa nos grupos experimentais. Em concreto os grupos experimentais II e IV apresentam valores mais baixos que os registados no grupo de controlo. As comparações entre conjunto dos grupos envolvidos registam valor significativo ($p=0,001$), mantendo-se essa significância aquando da comparação entre cada um dos grupos experimentais e o grupo de controlo II ($p < 0,05$).

Na estrona a significância estatística permanece para a comparação entre os diversos grupos envolvidos, igualmente com valores de maior grandeza para os grupos experimentais, sendo as diferenças significativas, quer nas comparações realizadas para o conjunto dos grupos ($p=0,001$), quer na comparação entre pares de grupos (experimental I, II e III versus grupo de controlo II; $p < 0,05$).

Sendo os valores de concentração de estradiol tabelados mais elevados que os observados para a estrona nos grupos experimentais I e III e menos elevados nos grupos experimentais II e IV, cruzaram-se estes dados com o número de habitantes servidos pelas ETARS estudadas no capítulo IV, conforme gráfico 9.

Gráfico 7- Comparação entre os pares de grupos experimentais e o nº de habitantes que são servidos pelos efluentes das ETARS (rios)



Para a estrona obtiveram-se valores mais elevados para os efluentes das ETARs que servem um nº de habitantes de 20 500 (ETAR 7) e 50 000 habitantes (ETAR 5), existindo um predomínio de valores mais elevados nos efluentes das ETARs que servem um nº de habitantes de 20 500 (ETAR 7) e 180 000 habitantes (ETAR 2), para o estradiol.

De acordo com os resultados obtidos, há uma evidência da persistência de estrona e estradiol à saída das ETARS estudadas, indicando claramente uma ineficiência na remoção destes compostos durante o tratamento das águas residuais, e que são sistematicamente lançadas nos rios, lagos e oceanos, afetando os ecossistemas e a água potável que serve as populações.

6.3 – Conclusão

Este estudo fornece evidências sugerindo que a prolongada exposição aos efluentes das ETARs pode causar efeitos cumulativos de estrona e estradiol em indivíduos do género masculino de indivíduos de rã-verde *Rana/Pelophylax perezi*. Devido à falta de estudos com valores de referência de concentração de estrogénios nestes indivíduos, é difícil dizer que os efeitos sejam comparáveis aos efeitos observados e descritos nos vários estudos efetuados em vertebrados, tais como feminização, infertilidade masculina, etc., possivelmente resultando num efeito ao nível da população. Pode-se, no entanto, deduzir que há processos cumulativos de estrogénios nestes indivíduos do género masculino, que têm o seu habitat natural em

ambientes de água doce, nos rios estudados, onde os efluentes das ETARs são lançados, com evidente potencial atividade estrogénica, já que os estrogénios pesquisados são hormonas femininas.

De referir ainda que ao longo da captura destes indivíduos ao longo dos rios, se observaram algumas fêmeas (que não estão incluídas neste estudo) que apresentavam algumas modificações anatómicas, nomeadamente uma pele mais fina, membros superiores e inferiores bastante mais alongados que o normal e uma extrema magreza.

De realçar ainda, que estes animais pela sua natural fisiologia e por viverem na água, têm sido permanente expostos à poluição química presente nos sistemas aquáticos, sendo a atividade estrogénica apontada como uma séria causa para declínio global das várias espécies de anfíbios e a crescente extinção destes animais.

Capítulo VII – Considerações finais

Atualmente a ocorrência de estrogénios naturais e sintéticos, enquanto fármacos e disruptores endócrinos, pode apresentar efeitos adversos nos humanos, organismos aquáticos e terrestres, podendo ser traduzido num preocupante problema de saúde pública e ambiental, a vários níveis.

Os fármacos como é sabido são desenvolvidos para serem persistentes, mantendo as suas propriedades químicas para servir um determinado fim terapêutico. Está descrito que cerca de 50 a 90% da dosagem de um determinado fármaco é excretada inalterada e persiste no meio ambiente, além de que a maioria destes fármacos possuem características lipofílicas, apresentando frequentemente baixa biodegradabilidade no meio ambiente (Goodman&Gilman, 2006, 11ª edição americana). Estas propriedades intrínsecas apresentam por isso, um grande potencial para bioacumulação e persistência.

As hormonas são poderosas moléculas mensageiras que controlam funções essenciais do corpo e após serem sintetizados, são transportados pela corrente sanguínea, no estado livre ou ligados a proteínas, e agem em locais específicos regulando ou alterando determinados órgãos ou funções, estabelecendo um modo de comunicação entre diferentes partes do corpo (Greenspan & Gardner, 2006, 7ª edição; Rehan, 2010).

Assim, a grande preocupação da presença dos fármacos residuais na água são os potenciais efeitos adversos para a saúde humana, animal e em organismos aquáticos.

Estudos demonstram que estes efeitos podem ser detetados a qualquer nível da hierarquia biológica: célula, órgãos, organismos populações e ecossistemas (Solé, Raldua, Barceló, & Porte, 2003). Como foi referido nos capítulos IV e VI desta dissertação, estudos têm ligado os DE a efeitos biológicos adversos em animais, dando origem a uma preocupação crescente de que níveis baixos possam causar efeitos similares em humanos, dependendo da dose e do tempo de exposição.

É fundamental e premente estimar a “entrada” dos estrogénios e a sua possível movimentação à superfície e nas águas residuais através do escoamento e lixiviação (Ying et al., 2002). Assim, a quantificação precisa de estrogénios naturais e sintéticos nos efluentes das ETARs é primordial na avaliação de uma potencial ocorrência de disrupção endócrina nos seres vivos em geral (Ying et al., 2000;), já que são continuamente lançados nos sistemas aquáticos, sem qualquer restrição (Bila et al., 2007).

Além da excreção natural dos estrogénios naturais pelos humanos e animais, há que ter uma atenção especial para os estrogénios sintéticos, não só os que são utilizados como anticoncepcionais e nas terapias hormonais, como também os resíduos hospitalares e da indústria farmacêutica, e até medicamentos com prazo de validade expirado e sua eficiente eliminação.

O estrogénio natural mais potente é o 17 β -estradiol, seguido pela estrona e pelo estriol (metabolito de E1 e E2). Os estrogénios naturais são rapidamente metabolizados pelo fígado, o que reduz a sua atividade quando administrados por via oral. Por manipulações químicas dos estrogénios naturais, obtiveram-se compostos semi-sintéticos com maior resistência hepática, e como tal mais ativos por via oral, salientando-se o etinilestradiol, entre outros. Estão disponíveis para administração oral, parenteral e transdérmica, e dado a sua natureza lipofílica, a absorção é geralmente boa na forma galénica mais apropriada.

Os estrogénios são absorvidos pelo organismo e sujeitos a reações metabólicas, sendo uma quantidade significativa desses compostos originais e metabolitos excretados na urina e fezes, sendo frequentemente encontradas nos esgotos domésticos, águas de abastecimento, solos e sedimentos.

A crescente preocupação com a presença de estrogénios e seus metabolitos em meios aquáticos e seus potenciais impactos ambientais, tem impulsionado a pesquisa de métodos cada vez mais sensíveis, capazes de permitir a deteção destes analitos em matrizes complexas.

Para a deteção e quantificação dos estrogénios os métodos descritos na literatura são baseados na extração em fase sólida, e conseqüentemente determinado por cromatografia gasosa ou líquida. No entanto, a análise dos estrogénios residuais em efluentes das ETARS, águas dos rios, água potável e de abastecimento, requer ainda maior sensibilidade e seletividade para a deteção de concentrações na faixa dos micro e nano por L⁻¹ (Alda & Barceló, 2001; Chan *et al.*, 1995; Fine *et al.*, 2003; Gabet *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008).

Neste estudo, foi efetuada uma otimização dos métodos analíticos com base num procedimento SPE-HPLC com deteção UV, para a determinação simultânea de estrogénios em amostras de água residuais.

Os níveis de concentração dos estrogénios quantificados nos afluentes das ETARS estudadas, variaram em intervalos de 0,14-0,51 µg L⁻¹ para o estradiol, 0,13-0,23 µg L⁻¹ para o etinilestradiol e 0,16-0,72 µg L⁻¹ para a estrona. Os níveis de concentrações dos estrogénios encontradas nos efluentes das mesmas variaram em intervalos de 0,10-0,20 µg L⁻¹ para o estradiol, 0,11 a 0,19 µg L⁻¹ para o etinilestradiol e 0,15-0,25 µg L⁻¹ para a estrona. Todos estes resultados indicam uma permanente entrada destes compostos nos rios, após o tratamento das águas residuais das ETARS estudadas, sublinhando-se ainda a falta de legislação em Portugal relativamente ao aparecimento destes compostos em efluentes das ETARs e conseqüentemente a sua remoção, por forma a minimizar-se a sua entrada nos sistemas aquáticos.

As ETARs são, de uma maneira geral, concebidas para a remoção do carbono, azoto e fosforo (Maaskant *et al.*, 1999), não sendo desenhadas para ter em atenção o tratamento de todos os contaminantes orgânicos, o aparecimento de compostos emergentes, na forma de subprodutos e seus metabolitos, que persistem após o tratamento das águas residuais, entrando desta forma no ambiente aquático, e posteriormente nas estações de tratamento de água que servem os habitantes. Os três estrogénios naturais, bem como o estrogénio sintético têm sido frequentemente detetadas em descargas de ETARs, devido à sua incompleta remoção durante o tratamento das águas residuais (Yan *et al.*, 2009; Sarmah *et al.*, 2006; Vulliet *et al.*, 2007; Laganá *et al.*, 2004). Uma das questões que se pode levantar é se estes conjugados dos

estrogénios naturais e sintéticos endocrinamente inativos podem ser convertidos nas formas ativas no meio ambiente ou nas Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs), aumentando a concentração ambiental destes

Os níveis de etinilestradiol encontrados nas águas de rios poderão indicar que aquele composto sintético consegue, na forma não degradada, ser transportado ao longo de grandes distâncias a partir dos locais de descarga de efluentes domésticos ou de estações de tratamento de águas residuais. Dependendo da composição pontual, das características químicas e físicas dessas águas residuais, os estrogénios naturais podem-se converter uns nos outros, sendo o estradiol considerado como sendo um dos maiores responsáveis pela disrupção endócrina, a par com o estrogénio sintético EE2.

Os estudos de degradação efetuados demonstraram que os estrogénios não podem ser degradados, ao abrigo da luz e sob efeito de temperatura a 4 °, 20 ° C e 30 °C. No entanto, sob radiação solar direta observou-se alguma taxa de degradação, após 126 dias, para todas as hormonas estudadas, no entanto, estudando outras condições ambientais, tais como, a presença de matéria orgânica natural, a atividade biológica e a variação do teor de oxigénio, podemos prever variabilidade nas taxas de degradação em condições naturais (Fonseca *et al.*, 2010).

Contudo, a possibilidade de bioacumulação nos organismos aquáticos e os potenciais efeitos ambientais destes compostos, aparentemente estáveis e biologicamente ativos, não são totalmente conhecidos. Vários estudos apontam que a exposição a estrogénios pode causar a feminização de peixes, anomalias no desenvolvimento/crescimento, hermafroditismo, alterações morfológicas, comportamentais, etc.

De entre os vários estudos efetuados em vertebrados e invertebrados descritos na literatura pesquisada, a maior parte foi feita em laboratório onde se expuseram as populações-alvo a concentrações de estrogénios e verificaram-se todas as alterações que ocorriam nesses animais. Noutros trabalhos efetuados *in situ*, expuseram-se os animais a concentrações ambientalmente relevantes, tendo-se verificado, por exemplo, mudanças de sexo em várias espécies de peixes, falta de reprodução em aves e anormalidades nos órgãos reprodutivos de jacarés e ursos polares (Mol *et al.*, 2000). Muitos têm sido os efeitos nocivos descritos nos diversos estudos efetuados em várias espécies de animais vertebrados e em invertebrados (menos estudados).

Devido aos conhecimentos pouco aprofundados dos mecanismos do sistema endócrino dos invertebrados é difícil afirmar que os efeitos observados face à exposição a estrogénios, são do mesmo tipo ou que correspondem a disrupção endócrina, como se observa nos peixes (Quinn *et al.*, 2004). Estes compostos poderão em algumas espécies de invertebrados apresentar outros mecanismos de toxicidade subletal com maior relevância ecotoxicológica, para além dos efeitos na performance reprodutiva ou no desenvolvimento (Hutchinson *et al.*, 1999).

Muitos são os estudos descritos na bibliografia, referidos no capítulo IV desta dissertação, com o objetivo de averiguar o efeito destes compostos na fisiologia, histologia e biologia molecular dos peixes expostos, mas em menor número, são os estudos que pretendem avaliar os seus potenciais efeitos ao nível da população, nomeadamente no que diz respeito ao sucesso na reprodução. Embora a presença de vitelogenina em peixes machos possa ser um indicador de uma potencial redução no sucesso reprodutivo de uma população exposta a estrogénios, usada isoladamente não pode ser considerada um biomarcador suficientemente sensível (Robinson, *et al.*, 2002).

É conhecida a maior susceptibilidade de indivíduos juvenis e/ou embriões a xenobióticos quando são expostos a estes compostos durante uma “janela crítica” do seu ciclo de desenvolvimento (Versonnen *et al.*, 2004). Assim, a intersexualidade poderá ocorrer com maior probabilidade, se a exposição aos compostos estrogénicos ocorrer durante os estádios em que verifica a diferenciação sexual dos indivíduos. Estes estádios correspondem às fases mais precoces dos ciclos de vida dos organismos (Solé *et al.*, 2002). A intersexualidade nos peixes é um fenómeno descrito para várias espécies que habitam em águas pouco sujeitas à ação do Homem contudo, no Reino Unido conseguiu-se estabelecer uma correlação entre efluentes domésticos e o grau de intersexualidade (Orne *et al.*, 2003).

Para além da intersexualidade, alguns dos efeitos mais observados após exposição de determinadas espécies de peixes machos a este tipo de compostos são, por exemplo, a redução na espermatogénese e alterações na fisiologia e comportamento reprodutivos, traduzindo-se globalmente numa diminuição no sucesso reprodutivo individual o que ao longo do tempo, poderá certamente traduzir-se em efeitos ao nível da população (Solé *et al.*, 2002).

O presente estudo efetuado com anfíbios, fornece evidências sugerindo que a prolongada exposição aos efluentes das ETARs pode causar efeitos cumulativos de estrona e estradiol em indivíduos do género masculino de indivíduos de rã-verde *Rana/Pelophylax perezi*. Para o

estradiol existe um predomínio de valores mais elevados nos grupos experimentais face ao grupo de controlo I, com diferenças estatisticamente significativas, ($p=0,001$). Na estrona a significância estatística permanece para a comparação entre os diversos grupos envolvidos, igualmente com valores mais elevados para os grupos experimentais. Devido à falta de valores de referência de concentração de estrogénios nestes indivíduos, é difícil dizer que os efeitos sejam comparáveis aos efeitos observados e descritos nos vários estudos efetuados em vertebrados, tais como feminização, infertilidade masculina, etc., possivelmente resultando num efeito ao nível da população. Pode-se, no entanto, inferir que há processos cumulativos de estrogénios nestes indivíduos que têm o seu habitat natural em ambientes de água doce, nos rios estudados, onde os efluentes das ETARs são lançados, com evidente potencial atividade estrogénica. De realçar ainda a pouca abundância destes animais nos locais de amostragem escolhidos, serão estes níveis de concentração, uma das causas para o seu declínio a nível mundial?

Mais estudos deverão ser realizados nos habitats próprios, *in situ*, com o intuito de avaliar se os efeitos observados ao nível individual poderão de algum modo traduzir-se na redução da performance reprodutiva de uma população continuamente exposta a concentrações residuais (dependendo estas concentrações da composição pontual das águas dos rios, após descarga dos efluentes das ETARs) dos componentes de estrogénios naturais e sintéticos e, se essas alterações poderão a longo prazo introduzir alterações no próprio ecossistema em que a espécie se encontra inserida.

Em Portugal, as informações sobre a ocorrência de estrogénios no ambiente são ainda algo limitadas. Seria desejável um levantamento detalhado para melhor compreender a distribuição destes compostos no ambiente, especialmente nos efluentes das ETARs, nos solos, nas águas superficiais e em águas subterrâneas. Vários estudos efetuados neste campo, noutros países, têm comprovado a seriedade e a diversidade de problemas que podem advir da exposição a estas substâncias.

Assim, o efeito dos fármacos e disruptores endócrinos, na saúde humana deve ser analisado de forma ordenada e qualitativa, tendo-se em consideração as preocupações e necessidades especiais da sociedade dentro das classes e produtos.

Como conclusão deste estudo, pensamos que num futuro próximo, se deve obrigatoriamente implementar um acompanhamento sistemático na determinação de estrógenos em todas as

ETARs, de acordo com o número de habitantes que cada uma serve, bem como legislação específica no controlo destes compostos nos efluentes das ETARs; na não utilização de lamas, provenientes do tratamento das águas residuais, como fertilizantes na agricultura; a separação de águas residuais domésticas, hospitalares e industriais e ainda o controlo de administração de hormonas nas pecuárias e aquaculturas.

Nos últimos quatro anos, e em face dos resultados dos vários estudos relativos à sistemática ocorrência e persistência de estrogénios no ambiente, muitos cientistas e pesquisadores pelo mundo, têm efetuado estudos sobre a melhor forma de remover estes compostos nos tratamentos das águas residuais. Contudo, ainda não se conseguiu um tratamento “milagroso” nas ETARs para estes compostos e outros igualmente nocivos, sendo este um caminho prioritário e obrigatório, como uma questão pertinente de saúde pública e ambiental.

A nível pessoal, além do muito que já foi referido e sublinhado, considero que estamos perante um grave e preocupante problema de saúde e que a motivação de realizar este trabalho, com todas as limitações que são normais em estudos experimentais desta natureza, foi e continua a ser conseguir que esta questão seja verdadeiramente analisada, num futuro muito próximo, de uma forma consciente, global, realista, sem interesses de qualquer natureza, somente pensar na saúde de todos os seres vivos deste Planeta, e, que se façam todos os possíveis e “impossíveis” para minimizar este problema a nível mundial.

Bibliografia

- ScienceLab*. (2005). Obtido em 16 de 02 de 2011, de Mterial Safety Data Sheet Estradiol:
<http://www.sciencelab.com>
- ScienceLab*. (2005). Obtido em 16 de 02 de 2011, de Mterial Safety Data Sheet Estriol:
<http://www.sciencelab.com>
- ScienceLab*. (2005). Obtido em 16 de 02 de 2011, de Material Safety Data Sheet Estrone:
<http://www.sciencelab.com>
- ScienceLab*. (2005). Obtido em 16 de 02 de 2011, de Material Safety Data Sheet Ethinylestradiol: <http://www.sciencelab.com>
- Alda, J., & Barceló, D. (2001). Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste water. *Fresenius J. Anal. Chem.* , 371, 437-447.
- Arauco, L. S. (2006). Efeito do extrato hidroalcoólico de própolis na composição leucocitária de sangue de girinos de rã-touro. *kempffiana*, 2(1): 35-44 .
- Baronti, C., Curini, R., D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., & Samperi, R. (2000). Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environmental Science and technology*, 34, 5059-5066.
- Belfroid, A., Murk, A., De Voogt, P., Schafer, A., Rijs, G., & Vethaak, A. (1999). Endocrine-disrupting compounds in water systems: a pilot study on the occurrence of estrogenic compounds in surface and waste waters in the Netherlands. *Report nos. 99.007/99.024 Institute for Coastal and Marine Management RIKZ*, 109.
- Belfroid, A., Van der Horst, A., Schafer, A., Rijs, G., Wegner, J., & Cofino, W. (1999). Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface waters and waste in the Netherlands. *The Science of the Total Environment.*, 225, 101-108.
- Bila et al, D. M. (2007). Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova*. vol 30 nº 3 651-666.

- Birkett, J., & Lester, J. (2003). *Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes*. Lewis Pub., ISBN 9781566706018.
- Brunton, L., Lazo, J., & Parker, K. (2006, 11ª edição). *As bases Farmacológicas da Terapêutica*. In G. & Gilman. Mc Graw Hill.
- Campani, D. M. (2010). Esteroides em águas residuárias - Estado de arte e Prespetivas de Tratamento - VII Simposio Internacional de Qualidade Ambiental. *Esteroides em águas residuárias*. Porto Alegre, Brasil.
- Cargouet, M., Perdiz, D., Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S., & Levi, Y. (2004). assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *The Science of the Total Environmental*, 324 (1-3), 55-66.
- Chambliss, H., & Shaul, P. (2002). *Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase*. Obtido em 24 de 03 de 2011, de <http://edrv.endojournals.org/cgi/content/full/23/5/665>
- Chan, K., Musehik, G., Issaq, H. J., & Siiteri, P. (1995). Separation of estrogens by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, 690, 149-154.
- Chiron, S., Minero, C., & Vione, D. (2006). Photodegradation processes of the antiepileptic drug carbamazepine relevant to estuarine waters. *Env. Sci. Technol.*, 40 (19), 5977-5983.
- D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., & Samperi, R. (2000). *Environ. Sci. Technol.*, 34, 5059.
- Desbrow, C. R., & Brighty, G. C. (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent, Chemical Fractionation and in vitro Biological Screening. *Environmental Sci. Technol.* 32 (11), 1549-1558.
- Dias, M., Luiz, M., Alegretti, P., Furlong, J., Amat-Guerri, F., Massad, W., et al. (2009). *J. Photoch. Photobio. A*, 202, 221.
- Dudley, R. E. (1985). Guidelines for immunoassay data processing. *Clin. Chem.* 31, 1264-1271.

- Farabee, M. (2001). *The endocrine system*. Obtido em 21 de 02 de 2011, de <http://www.emc.maricopa.edu/faculty/farabee/biobk/biobookendocr.html>
- Fatta, D., Nikolaou, A., Achilleos, A., & Meric, S. (2007). Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. *Trends in Analytical Chemistry*, 26, 515-533.
- Fauci, A., & Melgaço, A. (1998). *Harrison Medicina Interna, 14ª edição*. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1998, 2 vol. ISBN 85-86804-03-7.
- Ferreira, F. (1982). *Moderna Saúde Pública, 5ª edição*. Portugal: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Fine, D., Breidenbach, G., Price, T., & Hutchins, S. (2003). Quantitation of estrogens in ground water and swine lagoon samples using solid-phase extraction, pentafluorobenzyl/trimethylsilyl derivatizations and gas chromatography-negative ion chemical ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1017 (1-2), 167-185.
- Fonseca, A., Lima, D., & Esteves, V. (2010). Study of estrogenic hormones degradation using UV-Visible Spectroscopy and Capillary Electrophoresis. *Water, Air & Soil Pollution*, 215 (1-4), 441-447.
- Gabet, V., Bados, P., & Coquery, M. (2007). analysis of estrogens in environmental matrices. *Trends in Analytical Chemistry*, 26(11), 1113-1131.
- Gilman, A., & Goodman, L. (1996, 9ª edição). *Goodman&Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, cop 1996. XXI, 1436 p. ISBN 970-10-1161.
- Goodman&Gilman. (2006, 11ª edição americana). *As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro: mcgraw-Hill, cop 2006, XXV, 1821 p. ISBN 978-85-7726-001-0.
- Greenspan, F., & Gardner, D. (2006, 7ª edição). *Endocrinologia Básica e Clínica*. Mc Graw Hill.
- Halm, S., Pounds, N., Maddix, S., Rand-weaver, M., Sumpter, J., Hutchinson, T., et al. (2002). Exposure to exogenous 17 β - oestradiol disrupts P450aromB mRNA expression in the

- brain and gonad of adult fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicol.* , 60, 285-299.
- Hennion, M., & Barcelo, D. (1998). Strengths and limitations of immunoassays for effective and efficient use for pesticide analysis in water samples: a review. *Analytica chimica Acta*, 362, Nº 1, 3-34.
- Hutchinson, T., Pounds, N., Hampel, M., & Williams, T. (1999). Impact of natural and synthetic steroids on the survival, development and reproduction of marine copepods (*Tisbe battagliai*). *The Science of the Total Environ.* , 233, 167-179.
- Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, B. S., et al. (2003). Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *United Kingdom*.
- Johnson, A., & Sumpter, J. (2001). *Environ. Sci. Technol.*, 35, 4697.
- Johnson, A., Belfroid, A., & Di Corcia, A. (2000). *Sci. Total Environ.* 256, 163.
- Keith, S., Verbrugge, T., Snyder, D., Gross, E., Kannan, T., & Giesy, J. (1999). Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures. *Environ. Sci. Technol.*, 33 (16), 2814-2820.
- Kelly, C. (2000). Analysis of steroids in environmental water samples using solid-phase extraction and ion-trap gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, 5(4), 309-314.
- Kelly, G. (2000). Peripheral metabolism of thyroid hormones: a review. *Alternative Medicine Review*, 5(4), 306-333.
- Kinnberg, K. K., & Bjerregaard, P. (2003). Effects of octylphenol and 17 β - estradiol on the gonads of guppies (*poecilia reticulata*) exposed as adults via the water or as embryos via the mother. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 134, 45-55.

- Kitamura, K., Miyajima, T., Higashitani, N., Nakada, N., Komor, K., & Suzuki, Y. (2009). *J. Am. water Resour. As.*, 45, 22.
- Koger, C., Teh, S., & Hinton, D. (2000). Determining the sensitive development stages of intersex induction in madaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 β - estradiol or testosterone. *Marine environ. Research*, 50, 201-206.
- Kolpin, D., Furlong, E., Meyer, M., Thurman, E., Zaugg, S., Barber, L. B., et al. (2002). Pharmaceuticals, Hormones and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S: Streams 1999-2000: A National Reconnaissance. *Enviro. Sci. Technol.* 36 (6), 1202-1211.
- Kolpin, D., Furlong, E., Meyer, M., Thurman, E., Zaugg, S., Barber, L., et al. (2002). Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater contaminants in U.S. streams 1999-2000: a national reconnaissance. *Environn. Sci. Techonology*, 36(6), 1202-1211.
- Kumar, K., Mohan, S., & Sarma, P. (2009). Sortiptive removal of endocrine-disruptive compound (E3) from aqueous phase by batch and column studies: kinetic and mechanistic evaluation. *Journal of Hazardous Materials*, 164, 820-828.
- Kuster, M., López de Alda, M., & Barceló, D. (2005). Estrogens and progestogens in wastewater, sludg, sediments and soil. *Barcelona*.
- Laganá, A., Barceló, A., Leva, I., Faberti, A., Fago, G., & Marino, A. (2004). Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 501, 79-88.
- Larsson, D., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A., Olsson, P., et al. (1999). Ethinyloestradiol - an undesired fish contraceptive? *Aquatic Toxicology*, 45, 91-97.
- Lazarov, B. (2006). Method for determination of some selected steroid hormones and bisphenol A in water at low ng/L by on-line-solid-pfase extraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chemicals as Intentional and Accidental Global Environmental Threats*, 379-392.

- Leech, D., Snyder, M., & Wetzel, R. (2009). Natural organic matter and sunlight accelerate the degradation of 17 β -estradiol in water. *Science of the Total Environment*, 407, 2087-2092.
- López de Alda, M., & Barceló, D. (2001). *J. Chromatography A*, 938, 145.
- Maaskant, W., Hoeve, R., Ruhaak, A., & Rutten, A. (1999). *Reference book IMPEL-Inspect, EU Network for the implementation of environmental law*. The Netherlands: Nijmegen.
- Maot. (2000a). *Tratamento de águas residuais urbana. aglomerações. Sistemas de drenagem. Estações de tratamento de águas residuais urbanas (Portugal Continental)*. Lisboa.
- Maot. (2000b). *Plano estratégico de abastecimento de água e de saneamento de águas residuais (2000-2006)*. Lisboa: Gabinete do Ministro, Abril de 2000.
- Markey, C., Rubin, B., Soto, A., & Sonnenschein, C. (2001). Endocrine disruptors from Wingspread to environmental development biology. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20(1).
- Matamoros, V., Duhec, A., Albaigés, J., & Bayona, J. (2009). Photodegradation of carbazepine, ibuprofen, ketoprofen and ethinylestradiol in fresh and seawater. *Water Soil Pollut*, 196, 161-168.
- Miiller, J., & Miller, J. (2005.XVI). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. Harlow (England): Prentice Hall, 268 p. ISBN 0-13-129192-0.
- Ministério do Ambiente, d. O. (2004). *Avaliação do desempenho ambiental das estações de tratamento de águas residuais urbanas em Portugal Continental*. Lisboa.
- Mol, H., Sunarto, S., & Steijger, O. (2000). Determination of endocrine disruptors in water after derivatization with N-methyl_n using gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 879, 97-112.
- Mol, H., Sunarto, S., & Steijger, O. (2000). Determination of endocrine disruptors in water after derivatization, using gas chromatography with mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 879, 97-112.

- Mónica, W., & Scott, A. (2005). Photodegradation of the pharmaceuticals atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin and sulfamethoxazole in natural waters. *Aquatic Sciences*, 67, 177-188.
- Murray, R., Garnner, D., Mayes, P., & Rodwell, V. (1996). Harper's Biochemistry. In Stamford. Appleton & Lange.
- Nakari, T. (2004). Estrogenicity of municipal effluents assessed in vivo and vitro. *Environ. toxicol.*, 19, 207-215.
- Neamtu, M., Popa, D., & Frimmel, F. (2009). Simulated solar UV-irradiation of endocrine disrupting chemical octylphenol. *Journal of Hazardous Materials*, 164, 1561-1567.
- Noppe, H., Wasch, K., Poelmans, S., Van Hoof, N., Verslycke, T., Janssen, C., et al. (2005). *Anal. Bioanal. Chem.*, 382, 91.
- Orn, S., Holbech, H., Madsen, T., Norgreen, L., & Petersen, G. (2003). Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. *Aquatic Toxicology*, 65, 397-411.
- Palmer, B. H. (1998). Vitellogenin as a biomarker for xenobiotic estrogens in an amphibian model system. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol 17, nº1, 30-36.
- Palmer, J., Munro, N., & Landers, J. (1999). A universal concept for stacking neutral analytes in micellar capillary electrophoresis. *Anal. Chem*, 71, 1679-1687.
- Park, I.-S., Kim, J.-H., Cho, S., & Kim, D. (2004). Sex differentiation and hormonal sex reversal in the bagrid catfish *Pseudorasbora parva*. *Aquaculture*, 232, 183-193.
- Petrovic, M., Eljarrat, E., Alda, M., & Barceló, D. (2004). Endocrine disruptors compounds and other emerging contaminants in the environment: a survey in new monitoring strategies and occurrence data. *Anal. Bioanal. Chem.*, 378, 549-562.
- Quinn, B., Gagne, F., Costello, M., Mackenzi, C. W., & Mothersill. (2004). The endocrine disrupting effects of municipal effluent on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquatic Toxicology*, 66, 279-292.

- Quirino, J., Kim, J.-B., & Terabe, S. (2002). Sweeping: concentration mechanism and applications to high-sensitivity analysis in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 665, 357-373.
- Regan, F., Moran, A., Fogarty, B., & Dempsey, E. (2003). Novel modes of capillary electrophoresis for determination of endocrine disrupting chemicals. *Journal of chromatography A*, 1014 (1-2), 141-152.
- Rehan, K. (2010). *About the endocrine system: endocrine glands and hormones*. Obtido em 20 de 02 de 2011, de <http://www.endocrineweb.com/endocrinology/about-endocrine-system>
- Robinson, C., Brown, E., Craft, J., Davies, I., Moffat, C., Pirie, D., et al. (2002). Effects of sewage effluent and ethinyloestradiol. *Upon*.
- Robinson, C., Brown, E., Craft, J., Davies, I., Moffat, C., Pirie, D., et al. (2003). Effects of sewage effluent and ethinyestradiol upon molecular markers of oestrogenic exposure, maturation and reproductive success in the sand goby (*Pomatoschistus minutus*, Pallas). *Aquatic Toxicol.*, 62, 119-134.
- Rodgers, R. (1985). Guidelines for immunoassay data processing. *Clin. Chem.*, 31, 1264-1271.
- S.A., A. B. (s.d.). *Salivary hormone monitoring*. Obtido em 19 de 02 de 2011, de Salivary hormone monitoring: <http://www.aeron.com/estrone.htm>
- S.A., P. (s.d.). *Estriol - Compound summary*. Obtido em 19 de 02 de 2011, de <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi>
- Sarmah, A., Northcott, G., F., L., & Tremblay, L. (2006). A survey of endocrine disrupting chemicals (EDAs) in municipal sewage and animal waste effluents in the Waikato Region of New Zealand. *Science of the Total Environment*, 355, 135-144.
- Schneider, C., Scholer, H., & Schneider, R. (2004). A novel enzyme-linked immunosorbent assay for ethinylestradiol using a long-chain biotinylated EE2 derivative. *Steroids Snyder*, 69, 245-253.

- Servos, M., Bennie, D., Burnison, B., Jurkovic, A., McInnis, R., Neheli, T., et al. (2004). Distribution of estrogens 17 β -estradiol and estrone, in Canadian Municipal wastewater treatment Plants. *Sci. of the Total Environment*.
- Skoog, D., Nieman, T., & Holler, F. (2002). *Princípios de análise instrumental, 5ª edição*. Brasil: Bookman.
- Skoog, D., West, D., & Holler, F. (1995). *Analytical chemistry- an introduction, 7ª edição*. EU: saunders College Publishing.
- Skook, D., West, D., & Holler, F. (1996). *Fundamentals of analytical chemistry, 7ª edição*. EU: Saunders College Publishing.
- Snyder, D., Bach, N., Dillard, R., Draheim, S., carlson, D., Fox, N., et al. (1999). Pharmacology of LY315920/S-5920, a potent and selective secretory phospholipase A2 inhibitor: a new class of anti-inflammatory drugs, SPI. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1117-1124.
- Solé, M., Barceló, D., & Porte, C. (2002). Seasonal variation of plasmatic and hepatic vitellogenin and EROD activity in carp, cyprinus Carpio, in relation to sewage treatment plants. *Aquatic Toxicology*, 60, 233-248.
- Solé, M., Raldua, D., Barceló, D., & Porte, C. (2003). Long-term exposure effects in vitellogenin, sex hormones and biotransformation enzymes in female carp in relation to a sewage treatment works. *Ecotoxicology and environmental Safety*, 56, 373-380.
- Stafiej, A., & Regan, F. (2007). Determination of anti-inflammatory drugs and estrogens in water by HPLC with UV detection. *J. Sep. Sci.*, 30, 985-991.
- Streck, G. (2009). Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environmental. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(6), 635-652.
- Sumpter, J., & Johnson, A. (2006). Lessons from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environmental. *Environmental Science and Techonology*, 40, 1086-1087.

- Tapiero, H., G.N., B., & Tew, K. (2002). Estrogens and environmental estrogens. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 56(1), 36-44.
- Ternes, T., Bonerz, M., & Schmidt, T. (2001). Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 938, 175-185.
- Ternes, T., Kreckel, P., & Mueller, J. (1999). Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *The Science Total Environmental*, 225, 91-99.
- Thompson, M., Ellison, S., Fajgeij, A., Willets, P., & Wood, R. (1999). Harmonised guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. *Pure and Applied Chemistry*, 71, 337-348.
- Tusnelda, E., & Fritz, H. (2003). Fate of pharmaceuticals photodegradation by simulated solar UV-light. *Chemosphere*, 52, 1757-1769.
- Versonnen, B., & Janssen, C. (2004). Xenoestrogenic effects of ethinylestradiol in zebrafish (Danio Rerio). *Environmental Toxicology*, 19, 198-206.
- Versonnen, B., & Janssen, C. (2004). Xenoestrogenic effects of ethinylestradiol in Zebrafish (Danio rerio). *Environ. Toxicol.*, 19, 198-206.
- Vethaak, A., Rijs, G., Scharap, S., Ruiters, H., Gerritsen, A., & Lahr, J. (2002). *RIZA/RIKZ- report no. 2002.001*.
- Vieira, P., Rosa, M., & Alegre, H. (2007b). *Avaliação de desempenho das ETARS. Revisão do estado da arte e proposta de avaliação de desempenho*. Lisboa: LNEC/NES.
- Vieira, P., Rosa, M., Alegre, H., & Lucas, H. (2007a). *Estações de tratamento de água para consumo humano em Portugal. Informação Técnica Hidráulica ITH 44*. Lisboa: LNEC.
- Vulliet, E., Flament-Waton, M., & Grenier-Loustalot, M. (2007). Analytical methods for the determination of selected steroid sex hormones and corticosteroids in wastewater. *Anal. Bioanal. Chem.*, 387, 2143-2151.

- Wang, S., Xu, Z., Fang, G., Zhang, Y., & He, J. (2008). Separation and determination of estrone in environmental and drinking water using molecularly imprinted solid phase extraction coupled with HPLC. *J. Sep. Sci.*, 30, 1181-1188.
- Wise, A., O'Brien, K., & Woodruff, T. (2011). Are oral contraceptives a significant contributor to the estrogenicity of drinking water? . *Environmental Science Technology*, 45, 51-60.
- Xiao, L., Qiu, J., Sun, G., & Chen, Y. (2002). Effects of estrogen in the central nervous system. *Article in Chinese*, 32 (1), 27-30.
- Yakabe, C., Honda, A., & Magalhães, J. (2005). Determinação do 17 β -estradiol nas formas farmacêuticas gel e adesivo transdérmico. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41, 359-364.
- Yan, W., Feng, Q., Wei, Y., & Lin, J. (2009). Simultaneous determination of ten estrogens and their metabolites in waters by improved two-step SPE followed by LC-MS. *Chromatographia*, 69, 621-628.
- Ying, G., Kookana, R., & Ru, Y. (2002). Occurrence and fate of hormones steroids in the environment. *Environmental International*, 28, 545-551.
- Zhang, Z., Hibberd, A., & Zhou, J. (2006). Optimization of derivatization for the analysis of estrogenic compounds in water by solid-phase extraction gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica*, 577, 52-61.