

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRAÚLICA E SANEAMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA ENGENHARIA AMBIENTAL**

**“HORMÔNIOS ESTRÓGENOS NO RIO DO MONJOLINHO, SÃO CARLOS -
SP: UMA AVALIAÇÃO DA PROBLEMÁTICA DOS DESREGULADORES
ENDÓCRINOS AMBIENTAIS.”**

Ricardo Wagner Reis Filho

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Engenharia Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Vieira

**São Carlos
2008**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

R375h Reis Filho, Ricardo Wagner
 Hormônios estrógenos no rio do Monjolinho, São Carlos
 - SP : uma avaliação da problemática dos desreguladores
 endócrinos ambientais / Ricardo Wagner Reis Filho ;
 orientador Eny Maria Vieira. -- São Carlos, 2008.

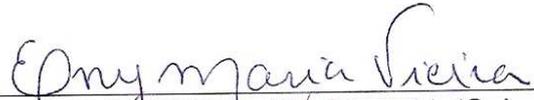
 Tese (Doutorado-Programa de Pós-Graduação e Área de
 Concentração em Ciências da Engenharia Ambiental) --
 Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São
 Paulo, 2008.

 1. Poluição ambiental. 2. Desregulação endócrina.
 3. Biomarcador. 4. Vitelogenina. 5. Ecotoxicologia.
 6. Risco ambiental. I. Título.

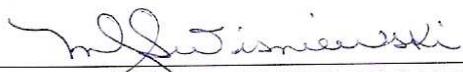
FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Oceanógrafo **RICARDO WAGNER REIS FILHO**

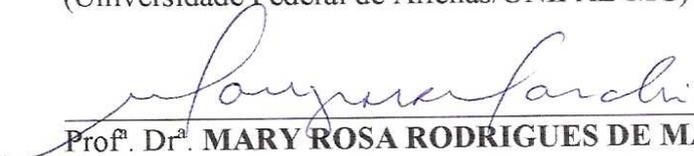
Tese defendida e julgada em 05/09/2008 perante a Comissão Julgadora:


Prof.^a. Dr.^a **ENY MARIA VIEIRA (Orientadora)**
(Instituto de Química de São Carlos/USP)

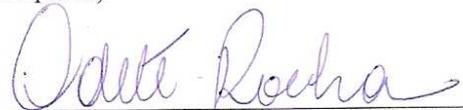
Aprovado


Prof.^a. Dr.^a **MARIA JOSE DOS SANTOS WISNIEWSKI**
(Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL-MG)

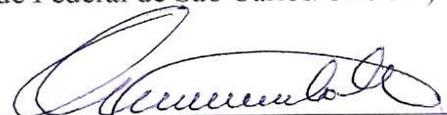
Aprovado


Prof.^a. Dr.^a **MARY ROSA RODRIGUES DE MARCHI**
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" /UNESP/Campus de Araraquara)

Aprovado

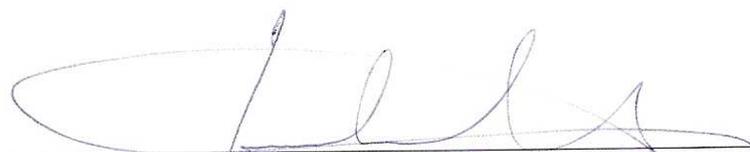

Prof.^a. Titular **ODETE ROCHA**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovado


Prof. Associado **VALDIR SCHALCH**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

APROVADO


Prof. Titular **MARCELO PEREIRA DE SOUZA**
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Engenharia Ambiental


Prof. Associado **GERALDO ROBERTO MARTINS DA COSTA**
Presidente da Comissão da Pós-Graduação da EESC

“... Haja inverno na Terra, não na mente.”

Ricardo Reis, heterônimo de Fernando Pessoa (1888 – 1935)

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Eny Maria Vieira, por ter “abraçado” a idéia e também pela confiança e otimismo.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutoramento.

À minha menina no planalto central, KARINA o AMOR vai sempre ser AMOR em qualquer lugar, em qualquer lugar...

A todos que foram solícitos dos vários laboratórios pelos quais perambulei em busca de auxílios tão preciosos.

Às famílias dos senhores Xu e Lin, que além da amizade, me transmitiram ensinamentos milenares físicos e espirituais.

Aos amigos, melhor: AOS AMIGOS VERDADEIROS!

“... da incredulidade do ser humano, que não acredita verdadeiramente em qualquer coisa nova até que tenha uma real experiência com ela.”

Maquiavel (1513). O Príncipe

SUMÁRIO

RESUMO	ii
SUMMARY	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	vi
INTRODUÇÃO	01
CAPÍTULO 1	17
Revisão	
CAPÍTULO 2	42
Análise Química	
CAPÍTULO 3	62
Biologia Molecular	
CAPÍTULO 4	94
Ensaio	
Ecotoxicológicos	
CAPÍTULO 5	119
Avaliação de Risco	
Ambiental	
Conclusões & Recomendações	147

RESUMO

A desregulação endócrina induzida por contaminação ambiental está entre os principais problemas criados pela sociedade moderna de consumo, responsável pela inserção no ambiente de uma série de substâncias interferentes nos sistemas hormonais dos mais diversos organismos, incluindo o próprio homem. A ação destes compostos acarreta, entre outros efeitos, disfunções reprodutivas e estudos apontam que também podem ser indutores de cânceres. A legislação brasileira através do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) determina os padrões de qualidade das águas, porém muitas substâncias com potencial de desregulação endócrina não tem suas concentrações e emissões especificadas. O objetivo deste trabalho foi executar um levantamento da presença e possíveis conseqüências dos hormônios estrogênicos, uma das classes mais potentes de desreguladores endócrinos (ED), nos compartimentos água e sedimento do Rio do Monjolinho. Este rio cruza parte da malha urbana da cidade de São Carlos – SP e recebe lançamentos localizados e difusos de esgotos domésticos e industriais. Portanto, amostras de água e sedimentos foram analisadas através de cromatografia líquida, e exemplares de peixes capturados no rio investigados quanto à presença da proteína vitelogenina (VTG) um biomarcador de exposição. Também ensaios ecotoxicológicos foram desenvolvidos em laboratório com diferentes abordagens para verificação de efeitos diversos. Em uma tentativa de abordar os dados gerados através de uma perspectiva ampla, foi delineada uma avaliação de risco ambiental discutindo as possíveis ameaças a biota e a população humana, já que concentrações de hormônios, principalmente o sintético etinilestradiol (Concentração máxima de $30,1 \pm 3,41 \text{ ng.L}^{-1}$), a indução da VTG e efeitos em ensaios ecotoxicológicos foram confirmados.

Palavras-chave: Desregulação endócrina, biomarcador, vitelogenina, ecotoxicologia, risco ambiental

SUMMARY

The environmental endocrine disruption is among the main problems arrived with the modern society way of life. The hormonal systems of several organisms are injured by a number of chemicals disposal on hydric bodies in erroneous way. These compounds causes reproductive disturbs, and studies pointed it be cancer inductors. The Brazilian National Environmental Council (CONAMA) do not regulated standards for discharges and concentrations of these substances. This work aims to investigate the probable presence and effects of sexual estrogens hormones, one of the most powerful groups of endocrine disruptors (EDCs), at the Monjolinho River. This small urban river is placed in São Carlos; a town located in the São Paulo state, Southwest Brazil, and receives concentrated and diffuse sewage effluents as industrials as domestics. Samples of water and sediments were analyzed by liquid chromatography, and male fishes captured were investigated to survey the vitellogenin protein (Vtg), a biomarker of exposition. To complement the study, ecotoxicological tests with different approaches were considered. Moreover an environmental risk analyze delineation was made because hormones concentrations, mainly the synthetic ethynilestradiol (EE2), VTG induction, and positive effects in ecotoxicity tests were found.

Key Words: Endocrine disruption, biomarker, vitellogenin, ecotoxicology, environmental risks

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Hipótese inicial levantada para desenvolvimento dos trabalhos de pesquisa.....	1
FIGURA 2	Seqüência de etapas que constituem as abordagens das questões relacionadas à contaminação por ED e formam o arcabouço da tese.....	2
FIGURA 3	Modelo simplificado da dinâmica hormonal.....	7
FIGURA 4	Comparação entre a atividade hormonal normal e distúrbios promovidos pelos ED.....	7
FIGURA 5	Localização dos pontos amostrais na bacia hidrográfica do Rio do Monjolinho.....	47
FIGURA 6	Amostragem de água em trecho urbano e rural no Rio do Monjolinho.....	49
FIGURA 7	Fluxograma dos passos usados para a análise dos hormônios estrogênicos nas amostras de água.....	50
FIGURA 8	Fluxograma dos passos usados para a análise dos hormônios estrogênicos nas amostras de sedimentos	51
FIGURA 9	Valores médios determinados para a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Carbono Orgânico Total (COT), Oxigênio Dissolvido e Coliformes Fecais para as estações de coleta no Rio do Monjolinho nos meses de agosto de 2005 e janeiro de 2006	53
FIGURA 10	Valores médios determinados para a condutividade, íons cloreto e íons sulfato para as estações de coleta no Rio do Monjolinho nos meses de agosto de 2005 e janeiro de 2006	53
FIGURA 11	Correlação entre o aumento das concentrações de etinilestradiol ([EE2]) e somatório dos parâmetros de qualidade de água (Σp) resultando em deterioração das águas do Rio do Monjolinho....	54
FIGURA 12	Composição granulométrica dos sedimentos do Rio do Monjolinho (Coleta 4)	54
FIGURA 13	Teor de matéria orgânica nos sedimentos do Rio do Monjolinho (Coleta 4)	55
FIGURA 14	Visualização seqüencial dos efeitos desencadeados devido à exposição à contaminantes	66
FIGURA 15	Amostragem de peixes em trecho urbano do Rio do Monjolinho e em área controle na zona rural	69
FIGURA 16	Procedimentos para retirada de sangue e tecidos hepáticos de peixes capturados	69
FIGURA 17	Método de eletroforese para identificação de proteínas.....	70
FIGURA 18	Fonte indutora de tensão ligada a uma das cubas eletrolíticas onde são executadas as corridas eletroforéticas	71
FIGURA 19	Géis resultantes durante o processo de revelação após corrida eletroforética	72
FIGURA 20	Processo de coloração dos géis com “coomassie brilliant blue” em mesa agitadora para caracterização das bandas protéicas.....	72
FIGURA 21	Fluxograma simplificado de uma RT-PCR	77
FIGURA 22	Exemplo de peixe capturado no Rio do Monjolinho e do tecido alvo de estudo	78

FIGURA 23	Amplificação do DNA da presumível proteína Vtg de <i>O. niloticus</i> através de RT-PCR	80
FIGURA 24	Mapa parcial do vetor TOPO (Invitrogen), mostrando o local de inserção do produto da RT-PCR	82
FIGURA 25	Exemplo de um dos géis obtidos nos ensaios de eletroforese para <i>Geophagus brasiliensis</i>	84
FIGURA 26	Exemplo de um dos géis obtidos nos ensaios de eletroforese para <i>Oreochromis niloticus</i>	85
FIGURA 27	Exemplo de um dos géis obtidos nos ensaios de eletroforese para <i>Oreochromis niloticus</i>	85
FIGURA 28	Produto de amplificação em gel de agarose 0,8%, transluminado com luz ultravioleta.....	88
FIGURA 29	Produto de amplificação em gel de agarose 0,8%, transluminado com luz ultravioleta (negativo).....	88
FIGURA 30	Disciplinas que contribuem para a abordagem ecotoxicológica em avaliações ambientais.....	95
FIGURA 31	Testes ecotoxicológicos com <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	97
FIGURA 32	Esquema demonstrando tipos de tratamentos desenvolvidos para avaliação das taxas de predação das larvas de <i>Chaoborus sp</i>	98
FIGURA 33	Aquários experimentais com os peixes <i>D. rerio</i> e <i>H. eques</i>	100
FIGURA 34	Configuração dos testes de ciclo de vida parcial para as espécies <i>D. rerio</i> e <i>H. eques</i> expostas ao hormônio sintético etinilestradiol (EE2).....	101
FIGURA 35	Seqüência de passos que conduzem a obtenção de amostras para serem aplicadas ao teste Elisa.....	102
FIGURA 36	Esquema da produção de vitelogenina por peixe macho exposto a substância DE e seqüência de passos do ensaio Elisa que leva adetecção das quantidades de Vtg.....	103
FIGURA 37	Localização das amostras do homogenado de <i>D. rerio</i> e <i>H. eques</i> aplicadas na placa de Elisa.....	105
FIGURA 38	Nº médio de neonatas produzidas durante testes de toxicidade crônicos com concentrações de etinilestradiol (EE2).....	106
FIGURA 39	Taxas de predação entre os diferentes tratamentos preliminares para as relações <i>Chaoborus sp</i> – <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	109
FIGURA 40	Taxas de predação de <i>Chaoborus sp</i> sobre <i>C. silvestrii</i>	109
FIGURA 41	Taxas de predação de <i>Chaoborus sp</i> sobre <i>C. silvestrii</i>	110
FIGURA 42	Leitora de microplaca Elisa TP-READER (Thermo plate).....	112
FIGURA 43	Concentrações médias de vitelogenina analisadas em homogenados de peixes mantidos em condições semi-estáticas por 60 dias.....	113
FIGURA 44	Componentes e inter-relações de uma análise de risco.....	121
FIGURA 45	Modelo Geral do Risco	135
FIGURA 46	Estratégia para efetuar a avaliação de risco ambiental associada à presença de estrógenos no Rio do Monjolinho.....	138
FIGURA 47	Esquema simplificado de uma avaliação de risco ambiental...	139
FIGURA 48	Representação hipotética da carga poluidora total de compostos estrogênicos imposta diariamente ao Rio do Monjolinho.....	141

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Dimensões dos problemas envolvendo a água: usos de água e fluxos de poluentes.....	4
TABELA 2	Mecanismos de desregulação endócrina promovido por diversos xenobióticos.....	8
TABELA 3	Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os hormônios estudados.....	44
TABELA 4	Valores médios do hormônio estrógeno sintético etinilestradiol (EE2) encontrados nas campanhas de coleta no Rio do Monjolinho.....	52
TABELA 5	Dados morfométricos para <i>Oreochromis niloticus</i> capturadas no Rio do Monjolinho e na Estação Controle.....	90
TABELA 6	Dimensões, divisões e características dos riscos associados aos desreguladores endócrinos.....	137
TABELA 7	Quantidade média de estrógenos naturais (E2 e E1) e sintéticos (EE2) diariamente excretados.....	140
TABELA 8	Concentração de estrógenos disponibilizada para o ambiente Caso1: Não existência de tratamento. Caso 2: Quantidades após remoção em ETE.....	140

1 – INTRODUÇÃO

1.1 Estrutura da Tese

O tema central deste estudo é a presença de hormônios exógenos ao ambiente aquático e suas conseqüências para a biota presente neste meio. Para tanto, o Rio do Monjolinho foi escolhido como “objeto” inicial de investigação, em razão do conhecido estado de degradação de suas águas (NOVELLI et al., 2007) principalmente devido aos lançamentos de esgotos sanitários.

Como todo trabalho científico, o ponto de partida baseou-se no levantamento de uma hipótese primordial (Figura 1) seguindo-se seu desenvolvimento e incorporação de hipóteses sucessivas e complementares, perfazendo deste modo um caminho pelo qual as respostas são obtidas.

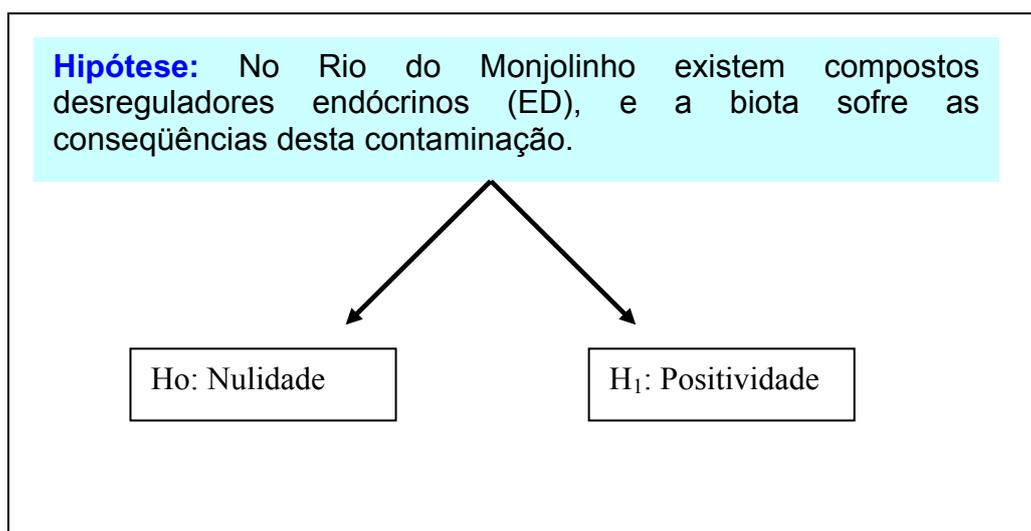


Figura 1 – Hipótese inicial levantada para desenvolvimento dos trabalhos de pesquisa.

Como a detecção e verificação de possíveis efeitos destas substâncias exigem a aplicação de métodos distintos envolvendo química analítica, biologia molecular e ensaios ecotoxicológicos, a presente tese foi estruturada em capítulos (Figura 2). Este modelo a princípio pode sugerir uma abordagem cartesiana, porém um olhar mais atento divisa claramente o aspecto holístico do estudo. Cada etapa serve de base e alavanca para a posterior, permitindo assim a integração dos dados gerados, pressuposto fundamental das ciências ambientais.

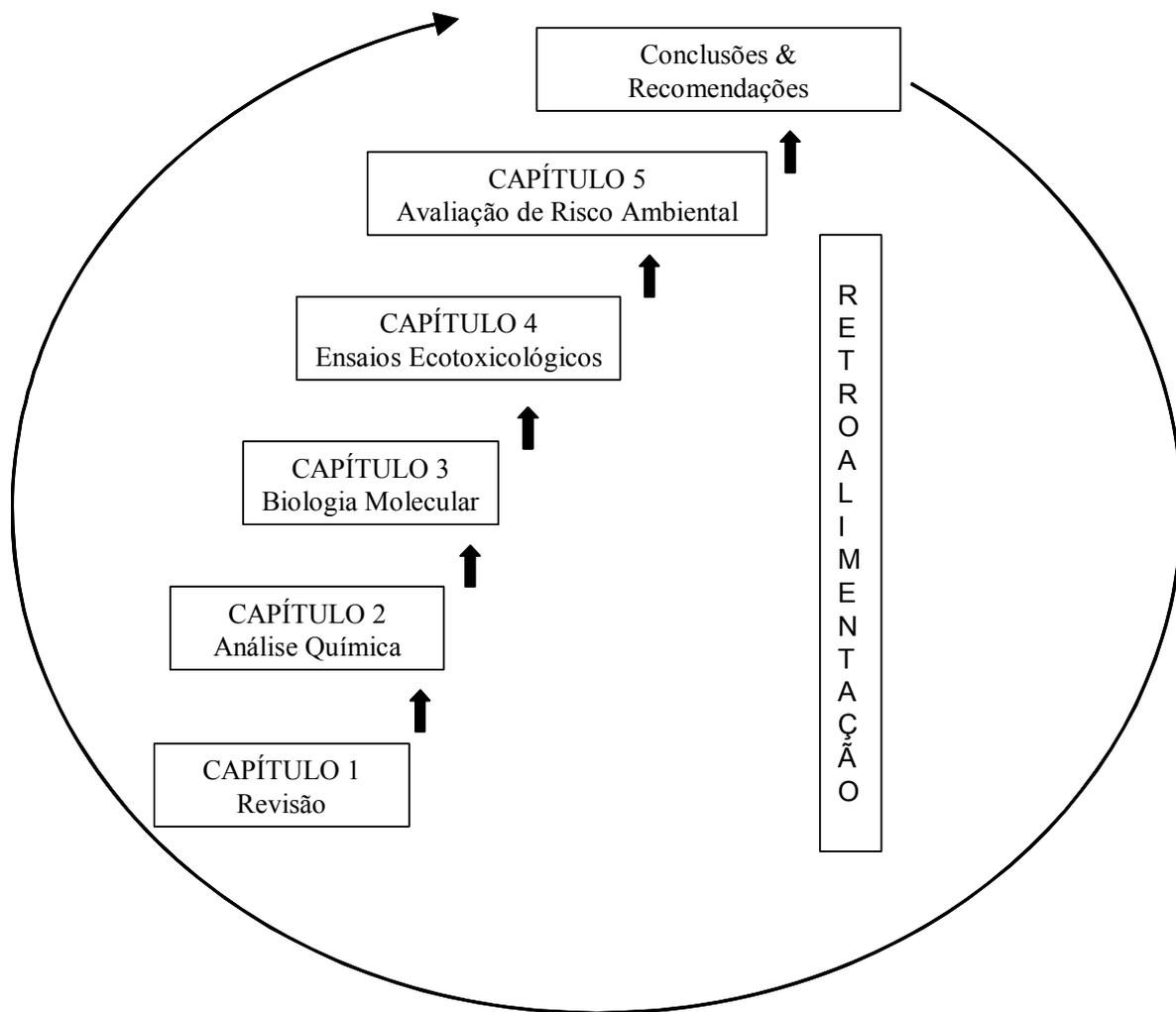


Figura 2 – Seqüência de etapas que constituem as abordagens das questões relacionadas à contaminação por DE e formam o arcabouço da tese.

1.2 A Sociedade Moderna e a Produção de Agentes Químicos

A utilização de produtos químicos data dos primórdios da civilização. Esses produtos são usados em nosso corpo, em nossos lares, campos, alimentos, transportes e certamente em quase todos os aspectos de nossas vidas (RAMLOGAN, 1997). Invariavelmente todos estes químicos utilizados externamente ou internamente (e seus produtos de transformação) têm o potencial de atingirem os sistemas naturais seja por ação intencional ou acidental.

Historicamente, existe uma longa lista de descuidos e descasos do homem para com o seu ambiente, e evidências mostram que a situação piorou drasticamente ao longo dos últimos trezentos anos (RAMLOGAN, op.cit.). Após o início da I Revolução Industrial (por volta de 1800) se procedeu a mecanização da produção que levou ao barateamento dos preços dos produtos e estimulou o consumismo (PIMENTEL et al., 2006), conseqüentemente as quantidades de resíduos cresceram abruptamente levando a degradação da qualidade ambiental.

Contemporaneamente devido ao avanço das tecnologias e refinamento dos processos produtivos em detrimento a esforços compatíveis de disposição e tratamento dos novos químicos gerados, a sociedade criou um paradoxo entre a busca de um padrão de vida melhor (com seus confortos e benefícios) e a deterioração do meio ambiente, visto que os dois campos são intrínsecos.

De acordo com o programa europeu para registro, avaliação e autorização de químicos (REACH, 2006) desde 1930, a produção global de químicos cresceu de um milhão de toneladas para mais de 400 milhões de toneladas anuais. Ainda segundo o comitê europeu, para aproximadamente 99% dos químicos em uso na Europa as informações sobre as propriedades, usos e riscos são incompletas ou insuficientes. O “Chemical Abstracts Service” (CAS, 2008) da sociedade americana de química possui até o momento aproximadamente 33 milhões de substâncias inorgânicas e orgânicas indexadas, sendo que por volta de 7,5 milhões destas substâncias estão comercialmente disponíveis. No Brasil, consultas aos endereços eletrônicos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008) não retornaram registros consistentes quanto às quantidades e número de substâncias em uso no país. No entanto um dado referente ao uso de anorexígenos (anfetaminas)

de 9,1 doses diárias para cada 1000 habitantes do país, possibilita conjecturar quanto as enormes quantidades de medicamentos (e também outras substâncias) usados diariamente no Brasil. Estas informações situam o quadro complexo que se apresenta em termos de produtivismo exacerbado e descarte de resíduos.

Sendo a água fundamental em todos os processos e etapas industriais, assim como em todos os usos humanos, este bem finito vem sofrendo pressões acentuadas quanto a sua sustentabilidade como recurso, seja para uso humano ou função ecológica. A compilação de alguns dados enfocando o ambiente aquático, conforme executada por SCHWARZENBACH et al., 2006 e traduzida na Tabela 1, sinalizam os diversos danos às águas devido aos fluxos de poluentes em razão das variadas atividades humanas.

Tabela 1 – Dimensões dos problemas envolvendo a água: usos de água e fluxos de poluentes (SCHWARZENBACH et al., 2006)

Apropriação humana do suprimento de água doce (km³/ano)	
Vazão total global	40.700
Vazão global acessível	12.500
Captação de água (total)	4.430
Agricultura	2.880
Indústria	975
Municipalidades	300
Perdas em reservatórios	275
Fluxos de macro-poluentes considerando-se os rios do mundo (10⁶ tons/ano)	
Nitrogênio inorgânico total (~ 75% antropogênico)	21
Fósforo total (60% antropogênico)	5.6
Fontes antropogênicas de metais para os sistemas aquáticos (10⁶ tons/ano)	
Zn, Cr, Ni, Cu, Cd, Hg	0.3 – 1
Fluxos antropogênicos que afetam a qualidade das águas (10⁶ tons/ano)	
Produção global de fertilizantes (2000)	140
Produção global de pesticidas	5
Produção de químicos orgânicos sintéticos	300
Derrames de óleo (média 1980 – 2000)	0.4

Os regimes hidrológicos parecem cada vez mais serem afetados em seu balanço. Estes “desvios” das condições naturais em razão das demandas humanas afetam a integridade do recurso nos seus vários compartimentos. Portanto a sociedade moderna precisa equacionar suas necessidades de uso com o valor natural da água que é o de sustentar os ecossistemas (BARON et al., 2002), sob o risco de que bens e serviços vitais para seu bem-estar sejam severamente prejudicados ou mesmo perdidos instalando-se assim a crise da água.

1.3 Desregulação Endócrina

Embora uma revisão crítica em forma de artigos seja apresentada no capítulo 1, uma breve apresentação da questão abrangendo os DE é necessária para situar o leitor.

Dentre o universo de substâncias existentes e continuamente desenvolvidas, surgiram na década de 1960 os primeiros indícios de contaminação por agentes hormonalmente ativos, os disruptores ou desreguladores endócrinos. Mais precisamente em 1962, a naturalista Rachel Carson, alertou o mundo para os perigos do emprego de pesticidas na agricultura, devido aos efeitos adversos destes compostos na reprodução de aves (CARSON, 2000). Apesar destes primeiros apontamentos e evidências, o fenômeno dos DE tornou-se um tópico de grande interesse na ciência ambiental somente no começo dos anos de 1990 devido a numerosos estudos demonstrando efeitos reprodutivos deletérios em humanos e na vida silvestre devido à presença de distintos compostos (BIRKETT, 2003). A atenção do público fora do meio científico também foi despertada devido ao lançamento do livro *Nosso Futuro Roubado* (COLBORN et al., 2002) que em linguagem acessível foca os efeitos ambientais e falhas reprodutivas desencadeadas por compostos sintéticos que agem como hormônios naturais. Em 2002 o programa internacional sobre segurança química (IPCS) promoveu uma publicação (DAMSTRA et al., 2002) resultante de extenso trabalho de vários grupos de pesquisadores que avaliaram o estado da arte global das questões abrangendo ED. Atualmente reuniões periódicas internacionais são efetuadas para revisão de tópicos e ordenamento de caminhos prioritários a serem desenvolvidos.

A definição adotada pelo IPCS (DAMSTRA, op. cit.) para o termo desregulador endócrino é o de uma substância exógena a qual altera as funções do sistema endócrino e conseqüentemente causa efeitos adversos na saúde de um organismo intacto, ou sua progênie ou (sub)populações. O sistema endócrino (também referido como sistema hormonal) é composto de glândulas localizadas por todo o organismo, hormônios que são sintetizados e secretados pelas glândulas na corrente sanguínea, proteínas carreadoras de hormônios, receptores situados nas membranas, citosol e núcleos das células dos vários órgãos alvo e de tecidos que reconhecem e respondem aos hormônios (USEPA, 2003). A função do sistema é controlar diversos processos biológicos, incluindo o desenvolvimento e funções dos sistemas reprodutivos, regulação do metabolismo, desenvolvimento do cérebro e de todo o sistema nervoso, e do desenvolvimento do organismo desde a sua concepção até a velhice. O funcionamento normal do sistema endócrino, portanto, contribui para a homeostase (a habilidade do corpo de se manter equilibrado na presença de mudanças internas e externas), além de controlar aspectos comportamentais dos organismos (USEPA, op. cit.). O sistema endócrino é presente em quase todos os animais, tanto vertebrados quanto invertebrados. Nos humanos, o sistema compreende mais de 50 tipos diferentes de hormônios, e a complexidade das outras espécies tende a ser comparável (USEPA, op. cit.). Hormônios são substâncias de ação sistêmica que exercem efeitos específicos em todas as células ou em determinadas células de um órgão. Desempenham funções reguladora, integradora, morfogenética e permissiva (FRIEDEN & LIPNER, 1975). A Figura 3 esquematiza de forma simplificada a dinâmica hormonal, é importante ressaltar que os DE podem manifestar seus efeitos em cada ponto deste ciclo; atuando nos sítios receptores, no conjunto de enzimas associado com a via, interferindo nos mecanismos de retro-alimentação e nas interconexões com os sistemas nervoso e imunológico (JACOBS, 2001).

Em situações onde ocorram DE com a forma e distribuição de cargas elétricas apropriadas a ligação entre os hormônios e sítios receptores pode ser bloqueada ou mimetizada com a possibilidade de desencadear respostas biológicas inadequadas (SPIRO & STIGLIANI, 2000). As alterações da atividade celular devido à “promiscuidade” dos receptores são exemplificadas na Figura 4, sendo os vários mecanismos de ação dos DE passíveis de induzirem danos sumariados na Tabela 2.

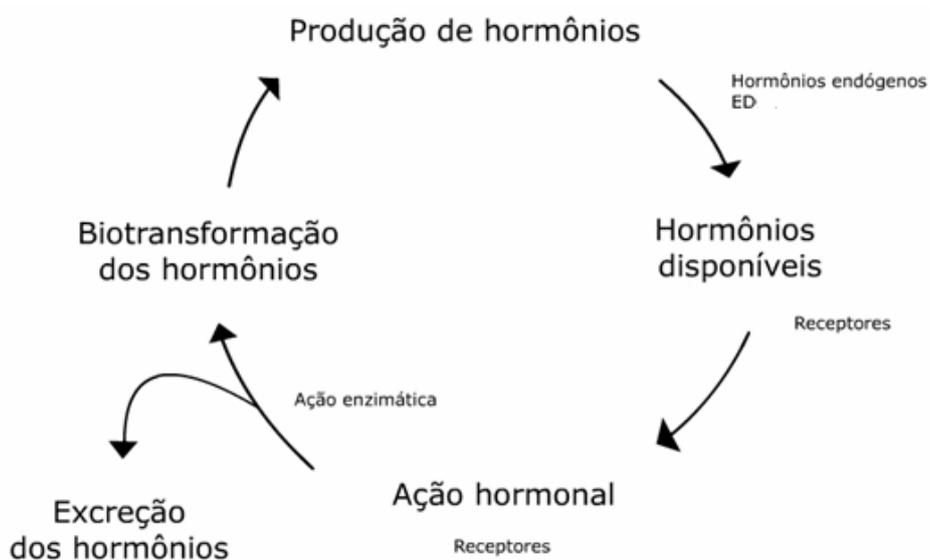


Figura 3 – Modelo simplificado da dinâmica hormonal (Modificado de CRAIN et al., 2000).

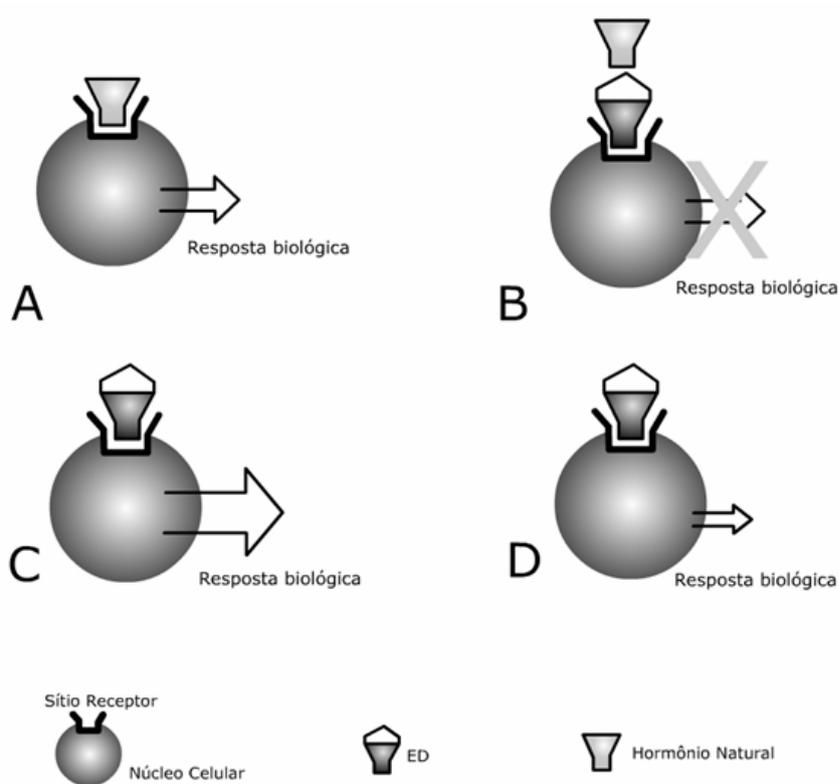


Figura 4 – Comparação entre a atividade hormonal normal e distúrbios promovidos pelos DE. Ativação hormonal sem interferência (A), DE bloqueando a ligação hormonal (B), DE originando reação excessiva (C), DE originando reação insuficiente (D).

Tabela 2 – Mecanismos de desregulação endócrina promovido por diversos xenobióticos (Tabela baseada em BIKERTT, 2003 e aperfeiçoada devido à consulta a textos de HARVEY & JOHNSON, 2002; ACC, 2002; SHAW & McCULLY, 2002; JANOŠEK, et al. 2006).

Diferentes mecanismos de ação utilizados pelos desreguladores endócrinos

Mecanismos	Processos
MIMETIZAÇÃO	Pela mimetização de hormônios naturais (conformidade estrutural), os DE são capazes de se encaixarem aos sítios receptores. A ocupação irregular dos sítios pode levar a respostas errôneas em relação ao tempo e disponibilidade de mensagens produzidas e/ou enviadas. Portanto as funções biológicas alvo são afetadas, sejam por aceleração/atraso ou superprodução/subprodução das mensagens codificadas.
BLOQUEIO	Pela ocupação dos sítios receptores nas células alguns DE inibem a ação dos hormônios endógenos impedindo a regularização das funções normais.
ESTIMULAÇÃO	Certos DE conseguem promover a formação de novos receptores. A presença de novos sítios de ligação provoca a amplificação (multiplicação) dos sinais hormonais.
ACELERAÇÃO ENDÓCRINA	Promoção da fragmentação e eliminação de hormônios, levando a depleção prematura dos mesmos.
AÇÃO ENZIMÁTICA	Interferência na seqüência enzimática de eliminação de hormônios (ação em cascata). A desativação de enzimas necessárias à degradação de hormônios implica em manutenção ativa destes no sistema, levando a respostas inapropriadas.
DESTRUIÇÃO	Destruição do hormônio ou da capacidade deste de executar suas funções. A incapacidade de execução de funções se dá devido à alteração na estrutura dos hormônios, levando a falhas nos acoplamentos com os sítios receptores.

Evidências sugerem que aproximadamente 87.000 substâncias antropogênicas possam desregular o sistema endócrino de humanos e animais (THACKER, 2005). Dentre estas diversas classes de compostos que podem atuar como DE, destacam-se os compostos esteróides, os biocidas,

surfactantes, compostos poliaromáticos, compostos orgânicos oxigenados e diversos fármacos e cosméticos. A diversidade é grande, pois na química sintética moderna o grupo fenólico funcional OH é comumente utilizado como substituinte, sendo que a maioria dos estrógenos naturais contém um ou mais grupamentos OH como parte de uma pequena molécula lipofílica de 200-300Da (WORTH & BALLS, 2002). Assim a conformação das moléculas produzidas “confunde” os sistemas dos organismos como se fossem compostos endógenos e desencadeiam efeitos adversos.

1.3.1 A significância ecológica da desregulação endócrina

Xenobióticos introduzidos no ambiente afetam adversamente os sistemas reprodutivos e imunológicos da vida silvestre. Estas vias de ação são suficientes para despertar preocupações em questão a sustentabilidade das espécies expostas a estes poluentes. Pois a resistência a doenças e a capacidade reprodutiva são duas premissas centrais na manutenção da estabilidade populacional por influenciar a regulação denso-dependente da mesma. Em uma definição formal (BERRYMAN, 2002): população é um grupo de indivíduos da mesma espécie que convivem em uma área de suficiente tamanho que permita dispersão e/ou comportamento migratório e onde as mudanças são amplamente determinadas por processos de nascimento e morte. Tomando uma notação matemática simples para descrever as mudanças no número de indivíduos dentro de uma população (P) considerando o tempo temos (BEGON et al., 2006):

$$P_{\text{futuro}} = P_{\text{presente}} + N - M + I - E$$

Sendo N os nascimentos, M o número de mortes, I o número de imigrantes e E o de emigrantes. Nesta visualização algébrica fica evidente a importância de fatores potencialmente alvos de DE (reprodução, crescimento/desenvolvimento, imunocompetência) para o equilíbrio populacional.

Em 1995 foi realizado o primeiro grande evento para discutir os efeitos dos DE em níveis superiores de organização biológica, população e comunidades (ANKLEY, et al., 1997), onde já se sugeria através de evidências correlacionais que populações naturais estavam sob risco, porém com um grau de incerteza ainda elevado, devido a ações de contaminantes que manifestavam efeitos através dos eixos hormonais. Encontro posterior ocorrido

na Inglaterra (IEH, 1999) para discutir as conseqüências para as populações expostas a DE ainda suscitaram muitas dúvidas. Porém, a questão, já preocupante, começou a se agravar com a publicação de uma nota na revista *Environmental Science & Technology* intitulada: Estrogen knocks out fish in whole-lake experiment (PELLEY, 2003). O texto relatava que pela primeira vez havia sido confirmado o colapso de populações de peixes (*Pimephales promelas*) expostos a concentrações ambientalmente relevantes, ou seja, normalmente encontradas a jusante de estações de tratamento de efluentes (ETE) e que estudos com espécies de ciclo de vida mais longo estavam em andamento. Recentemente este trabalho foi publicado (KIDD, et al., 2007), sendo que pesquisadores do Canadá e dos EUA continuam avaliando efeitos sobre populações de outros níveis tróficos nas regiões experimentais de lagos canadenses. Vários trabalhos discutindo a relevância ecológica dos DE encontram-se reunidos na monografia editada por JOBLING & TYLER, 2006.

As indicações de BRÖNMARCK & HANSSON, 2002 que colocam os DE entre os principais problemas de dano para o ambiente, parecem ser reforçadas frente ao surgimento de novos trabalhos que reportam a periculosidade dos DE para a ecologia das populações. Tanto que a “Declaração de Praga”¹ sobre os desreguladores endócrinos, com mais de 200 pesquisadores de todo mundo como signatários, entre outros importantes apontamentos, cita em seu inciso 36 da capacidade dos DE de colocarem em risco a biodiversidade.

1.4 Rios Urbanos

Um aspecto importante relacionado à problemática dos rios urbanos é seu valor enquanto bem estético (paisagístico) e cultural (YLI-PELKONEN, et al., 2006), a desvinculação da sociedade para com este “espaço” acarreta em perda da importância dada a este recurso natural. No almejar de uma melhor qualidade de vida é preciso restaurar esta importância fazendo com que a dinâmica entre os sistemas ecológico e social seja harmônica.

Os rios são sistemas complexos caracterizados como escoadouros naturais das áreas de drenagem adjacentes (DE TOLEDO & NICOLELLA, 2002). Quando estas áreas adjacentes são transformadas, como no caso das

¹ The Prague Declaration on Endocrine Disruption. Workshop on 10 – 12 May 2005. Material disponível em: <http://www.ehponline.org/docs/2007/10517/suppl.pdf>, acessada em dezembro de 2007.

idades, problemas em relação à qualidade das águas são esperados devido a impermeabilizações, corte das matas ripárias ou ciliares e lançamento de agentes contaminantes provenientes de fontes diversas. De acordo com DIAS, 1997 recorrendo ao pensamento de BOYDEN et al., 1981 a cidade, do ponto de vista ecológico, é, de muitas maneiras, vista como um gigantesco animal imóvel: consome oxigênio, água, combustíveis, alimentos e excreta despejos orgânicos (e inorgânicos) e gases poluentes. Aproveitando esta analogia, podemos fazer um exercício metafórico onde os rios urbanos seriam os vasos por onde circulam os produtos de excreção deste parasita até o lançamento para fora dos limites da cidade.

A perda das matas ciliares é uma forçante de degradação para os rios, pois elas possuem, entre outras funções, a capacidade de reterem contaminantes como também evitarem processos erosivos que contribuem para assoreamentos parciais e disposição de particulados para os cursos d'água (MANDER, et al., 2005). Nas cidades a pressão inconseqüente por espaços habitacionais, comerciais e industriais e por vias de tráfego leva a restrições de áreas ocupadas pelas matas ciliares, quando não a sua completa extirpação. Assim os rios perdem uma importante proteção natural, pois os fluxos de contaminantes não encontram amenização nestas áreas de transição solo-água.

Outra importante característica do meio urbano que influencia diretamente na qualidade das águas é a impermeabilização do solo através da aplicação de diferentes revestimentos. PAUL & MEYER, 2001 mostram as relações diretas entre o isolamento do solo e o escoamento ("runoff"), e as indiretas com a evapotranspiração e infiltrações rasas e profundas. Estes fatores fazem com que fluxos de água contendo diferenciadas substâncias químicas alcancem facilmente os rios que cruzam a malha urbana, notavelmente em situações de chuvas ("stormwater pollution").

A degradação das águas e sedimentos de rios devido a emissões diversas é fato amplamente documentado na literatura ambiental (PETERS & MEYBECK, 2000; MEYBECK, 2003). A presença de distintos tipos de poluentes desencadeia impactos negativos na integridade biótica aquática, alterando sua composição e estrutura (MILTNER, et al., 2004), levando desequilíbrio às teias tróficas existentes.

O Rio do Monjolinho se insere neste contexto recebendo aportes localizados e difusos da cidade “que o abraça”.

2 – JUSTIFICATIVA PARA REALIZAÇÃO DO TRABALHO

A qualidade ambiental é a base para a preservação da vida das futuras gerações, sendo a água a substância que sustenta e permite a estruturação da sociedade humana. Supõe-se que a cada vinte anos dobram os volumes de água consumida pela humanidade (DE FREITAS, 2000), portanto é premente a necessidade de se implantar uma nova mentalidade de gerenciamento deste recurso, onde o valor de uso e o valor intrínseco (valor de existência) alcancem equilíbrio.

A proteção das águas quanto aos níveis de DE insere-se nesta nova postura que visa garantir sua qualidade física e química, a qual implica diretamente na saúde humana, e de sustentabilidade da biodiversidade.

Um ponto de destaque na questão envolvendo DE são os efeitos sobre as espécies de peixes, principalmente no que tange aos processos reprodutivos e de desenvolvimento em que a adição destes “sinais” hormonais ao meio pode a longo prazo levar ao colapso de populações em função das alterações e interferências que provocam na ontogenia destes organismos.

Cientes desta questão e devido ao teor nocivo dos compostos com atividade estrogênica, a comunidade científica internacional vem realçando sobremaneira a importância de investigações quanto à disposição/destino e efeitos destes contaminantes.

A pesquisa brasileira, apesar das dificuldades, sempre se notabilizou em produzir estudos nas mais diversas áreas do conhecimento, em relação à desregulação endócrina é essencial que estudos comecem a ser desenvolvidos para que o país se alinhe com as novas tendências da área ambiental.

3 – OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Principal

Verificar a presença/ausência de substâncias desreguladoras endócrinas, especificamente hormônios sexuais estrógenos nas águas e sedimentos do Rio do Monjolinho.

3.2 – Objetivos Específicos

- Verificar se tilápias que habitam as águas do Rio do Monjolinho, apresentam indícios de efeitos devido à contaminação de compostos desreguladores endócrinos.

- Desenvolver uma técnica em biologia molecular que propicie a avaliação de exposição à DE (biomarcador Vtg mRNA) para a tilápia *Oreochromis niloticus*.

- Executar ensaios de toxicidade de hormônios que estejam presentes no Rio do Monjolinho em concentrações ambientalmente relevantes, dentro do escopo de abrangência deste trabalho.

- Avaliar o grau de percepção de parte da população em relação a questões envolvendo rios urbanos, e despertar o interesse para as implicações do descarte incorreto de fármacos.

- Delinear uma avaliação de risco ambiental considerando a exposição à DE.

4 – REFERÊNCIAS

ACC (American Chemistry Council). 2002. Chemicals in The Environment and The Endocrine System. 108p.

ANKLEY, G.T., JOHNSON, R.D., TOTH, G., FOLMAR, L.C., DETENBECK, N.E., BRADBURY, S.P. 1997. Development of a research strategy for assessing the ecological risk of endocrine disruptors. Rev. Toxicol. Ser. B: Environ. Toxicol., 1: 231-267.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). 2008. disponível em: www.anvisa.gov.br/hotsite/sngpc/apresenta.htm acessada em janeiro de 2008.

BARON, J.S., POFF, N.L., ARGEMEIER, P.L., DAHM, C.N., GLEICK, P.H., HAIRSTON Jr., N.G., JACKSON, R.B., JOHNSTON, C.A., RICHTER, B.D., STEINMAN, A.D. 2002. Meeting ecological and societal needs to freshwater. Ecological Applications, 12(5): 1247-1260.

BEGON, M., TOWNSEND, C.R., HARPER, J.L. 2006. Ecology from Individuals to Ecosystems. Blackwell. 738p.

BERRYMAN, A.A. 2002. Population: A central concept for ecology? OIKOS, 97(3): 439-442.

BIRKETT, J.W. 2003. Scope of the problem. In: BIRKETT, J.W. & LESTER, J.N. (eds). Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Process. CRC Press. pp. 9-43.

BOYDEN, S., MILLAR, S., NEWCOMBE, K., O'NEILL, B. 1981. The ecology of a city and its people. Australian National University Press. 437p.

BRÖNMARK, C. & HANSSON, L.A. 2002. Environmental issues in lakes and ponds: Current state and perspectives. Environmental Conservation, 29(3): 290-306.

CARSON, R. 2000 (reimpressão). Silent Spring. Penguin Books. 323p.

CAS (Chemical Abstracts Service). 2008. The latest CAS registry number[®]. American Chemical Society. Disponível em: www.cas.org/cgi-bin/regreport.pl acessada em janeiro de 2008.

COLBORN, T., DUMANOSKI, D., MYERS, J.P. 2002. O Futuro Roubado. LP&M. 354p.

CRAIN, D.A., ROONEY, A.A., ORLANDO, E.F., GUILLETTE Jr., L.J. 2000. Endocrine Disrupting Contaminants and Hormone dynamics: Lessons from Wildlife. In: GUILLETTE Jr., L.J. & CRAIN, D.A. (eds.). Environmental Endocrine Disrupters, an Evolutionary Perspective. Taylor & Francis. pp. 1-21.

DAMSTRA, T., BARLOW, S., BERGMAN, A., KAVLOCK, R., Van Der KRAAK, G. (eds.). 2002. Global Assessment of The State of The Science of The Endocrine Disruptors. WHO/IPCS. 180p.

DE FREITAS, A.J. 2000. Gestão de Recursos Hídricos. In: DA SILVA, D.D. & PRUSKI, F.F. (eds.) Gestão de Recursos Hídricos: Aspectos legais, econômicos, administrativos e sociais. MMA/UFV/ABRH. pp. 1-120.

DE TOLEDO, L.G. & NICOLELLA, G. 2002. Índice de qualidade de água em microbacias sob uso agrícola e urbano. *Sci. Agr.*, 59(1): 181-186

DIAS, G.F. 1997. Elementos de Ecologia Urbana e Sua Estrutura Ecológica. IBAMA/MMA. 48p.

FRIEDEN, E. & LIPNER, H. 1975. *Endocrinologia Bioquímica dos Vertebrados*. Edgar Blucher. 131p.

HARVEY, P.W. & JOHNSON, I. 2002. Approaches to the assessment of toxicity data with endpoints related with endocrine disruption. *J. Appl. Toxicol.*, 22: 241-247.

IEH (Institute for Environmental and Health). 1999. IEH Assessment on The Ecological Significance of Endocrine Disruption: Effects on Reproductive Function and Consequences for Natural Populations. 266p.

JACOBS, M. 2001. Unsafe sex: How endocrine disruptors work. Pesticide Action Network (PAN). Briefing 4. 14p.

JANOŠECK, J., HILSCEROVÁ, K., BLÁHA, L., HOLOUBEK, I. 2006. Environmental xenobiotics and nuclear receptors- Interactions, effects and in vitro assessment. *Toxicology in Vitro*, 20: 18-37.

JOBLING, S. & TYLER, C.R. (eds.). 2006. The ecological relevance of chemically induced endocrine disruption in wildlife. *Environ. Health Perspect.*, 114(Supplement 1): 1-160.

KIDD, K.A., BLANCHFIELD, P.J., MILLS, K.H., PALACE, V.P., EVANS, R.E., LAZORCHAK, J.M., FLICK, R.W. 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *PNAS*, 104(21): 8897-8901.

MANDER, U., KUUSEMETS, V., HAYAKAWA, Y. 2005. Purification processes, ecological functions, planning and design of riparian buffer zones in agricultural watersheds. *Ecological Engineering*, 24:421-432.

MEYBECK, M. 2003. Global analysis of the river systems: From earth system controls to anthropocene syndromes. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 358: 1935-1955.

MILTNER, R.J., WHITE, D., YODER, C. 2004. The biotic integrity of streams in urban and suburbanizing landscapes. *Landscape and Urban Planning*, 69: 87-100.

NOVELLI, A., MOTHEO, D.F., DELELLO, D., OKUMURA, D.T., TONISSI, F.B., MASSARO, F.C., JANKE, H., PRINTES, L.B., NUNES, M.E.T., LIMA, P.C.G., REIS FILHO, R.W., ESPÍNDOLA, E.L.G. 2007; Environmental Risk assessment

of the Monjolinho River, São Carlos, SP (Brazil). VIII Congress SETAC LA, Montevideo (Uruguay), 8-11 October 2007.

PAUL, M.J. & MEYER, J.L. 2001. Streams in the urban landscape. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 32: 333-365.

PELLEY, J. 2003. Estrogen knocks out fish in whole-lake experiment. *Environmental Science and Technology*, September (1): 313A-314A.

PETERS, N.E., MEYBECK, M. 2000. Water quality degradation effects on freshwater availability: impacts of human activities. *Water International*, 25(2): 185-193.

PIMENTEL, L.C.F., CHAVES, C.R., FREIRE, L.A.A., AFONSO, J.C. 2006. O inacreditável emprego de produtos químicos perigosos no passado. *Quim. Nova*, 29(5): 1138-1149.

RAMLOGAN, R. 1997. Environment and human health: A threat to all. *Environmental Management and Health*, 8(2): 51-66.

REACH (Registration, Evaluation, and Authorization of Chemicals). 2006. Environmental fact sheet: REACH- a new chemicals policy for the EU. Disponível em: www.europa.eu.int/comm/environment/chemicals/reach.htm acessada em dezembro de 2007.

SCHWARZENBACH, R.P., ESCHER, B.I., FENNER, K. HOFSTETTER, T.B., JOHNSON, C.A., VON GUNTEN, U., WEHRLI, B. 2006. The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science*, 313: 1072-1077.

SHAW, I. & McCULLY, S. 2002. A review of the potential impact of dietary endocrine disrupters on the consumer. *International Journal of Food Science and Technol.*, 37:471-476.

SPIRO, T.S. & STIGLIANI, W.N. 2000. *Chemistry of the Environment*. Prentice Hall. 356p.

THACKER, P.D. 2005. Sensing environmental estrogens. *Environmental Science and Technology*, September (1): 360A.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). 2003. *White Paper on Species/Strain/Stock in Endocrine Disruptor Assay*. 97p.

WORTH, J.A. & BALLS, M. 2002. Endocrine disruption in humans. *ATLA*, 30(Supplement 1): 103-113.

YLI-PELKONEN, V., PISPA, K., HELLE, I. 2006. The role of stream ecosystems in urban planning. *Management of Environmental Quality*, 17(6): 673-688.

CAPÍTULO 1: REVISÃO

Investigar um assunto com a intenção de se aprofundar e buscar o “estado da arte” do tema pesquisado é sempre uma tarefa enriquecedora para o cientista. O levantamento de dados e informações faz com que se amplie o campo de visão e fornece idéias (e dúvidas) que serão exploradas no desenvolvimento da pesquisa proponente.

Neste intuito foi realizada uma ampla revisão que buscou abranger os diversos ângulos relacionados com a questão da desregulação endócrina. Outro ponto que deve ser frisado foi que além de levantar conhecimentos para melhor embasar a pesquisa, a revisão foi direcionada para a elaboração de textos de divulgação científica, pois a área é ainda pouco abordada na literatura nacional. Deste modo o presente capítulo constitui-se em artigos publicados que versam sobre a introdução destes compostos no meio ambiente, alerta sobre seus efeitos e argumenta possíveis formas de minimizar o problema.

4 – ARTIGOS DE REVISÃO

4.1 1º Artigo

Título: HORMÔNIOS SEXUAIS ESTRÓGENOS: CONTAMINANTES
BIOATIVOS

Periódico: Química Nova

Ricardo Wagner Reis Filho*

Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 292, 13560-790 São Carlos - SP, Brasil

Juliana Coutinho de Araújo e Eny Maria Vieira

Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 780, 13560-970 São Carlos - SP, Brasil

Recebido em 3/3/05; aceito em 7/10/05; publicado na web em 12/4/06

SEXUAL ESTROGENIC HORMONES: BIOACTIVE CONTAMINANTS. Natural and synthetic estrogens have been detected in rivers, lakes and estuaries in several parts of the world. The primary sources of these compounds are the industrial and household effluents, which are not eliminated by the received treatment. This paper presents a brief description of the problem as well as the physical and chemical characteristics of the main compounds, the environmental behavior, methods of determination, ecotoxicological aspects and a discussion about its relevance in terms of ecology and public health.

Keywords: hormones; endocrine disrupters, environmental chemistry.

CONTEXTUALIZAÇÃO

Um dos campos mais proeminentes da química ambiental é o estudo de micropoluentes orgânicos em ambientes aquáticos. Micropoluentes orgânicos são substâncias que mesmo estando presentes em pequenas concentrações, são capazes de desencadear efeitos sobre os sistemas em que são introduzidos. O termo vem sendo empregado há muito tempo tanto que Mackay¹, em 1982, já classificava como micropoluentes os compostos químicos usualmente detectados em concentrações abaixo de 1 parte por milhão (1 mg L⁻¹). Porém, dentro deste grande grupo que virtualmente compreende um universo de milhares de compostos, os chamados disruptores endócrinos vêm se destacando em importância.

A USEPA² ("United States Environmental Protection Agency") define disruptores endócrinos (EDCs) como agentes exógenos que interferem na síntese, secreção, transporte, recepção, ação, ou eliminação dos hormônios naturais do corpo, que são responsáveis pela manutenção da homeostase (preservação da constância interna), reprodução, desenvolvimento e comportamento. A Comunidade Européia³ estende os efeitos adversos dos EDCs à prole dos organismos expostos. A ação dos EDCs dá-se pelo bloqueio, pela mimetização, estimulação, ou inibição da produção dos hormônios naturais⁴. Estes compostos são amplamente utilizados pela sociedade moderna⁵, sendo encontrados em produtos farmacêuticos, produtos de uso pessoal (como ex. as fragrâncias), pesticidas, antioxidantes, plásticos, produtos industrializados, tensoativos entre outros.

A primeira hipótese sobre os efeitos dos EDCs foi levantada na década de 1980, com a observação de características femininas em machos de aves coloniais da região dos Grandes Lagos (EUA-Canadá) expostos a agrotóxicos, sendo o mesmo fenômeno relatado em populações de jacarés de lagos da Flórida⁶. Mas somente na década de 90 a questão emergiu como sendo uma das principais no campo da pesquisa ambiental moderna⁷, existindo uma intensa produção na área⁸ com tendência de crescimento ainda maior, devido à abrangência dos tópicos e desafios relacionados com o tema.

O SISTEMA ENDÓCRINO E OS HORMÔNIOS ESTRÓGENOS NATURAIS E SINTÉTICOS

O sistema endócrino é um mecanismo complexo que coordena e regula a comunicação entre as células, constituído por combinações de glândulas e hormônios, sendo responsável pelas funções biológicas normais, como reprodução, desenvolvimento embrionário, crescimento e metabolismo⁹. Hormônios são mensageiros químicos que respondem pela comunicação entre diferentes tipos de células, as quais identificam os hormônios através de receptores que são estruturas protéicas especializadas em reconhecimento molecular¹⁰. Depois da aproximação e interação (hormônio-receptor) ocorre uma série de reações bioquímicas, levando a respostas biológicas específicas.

Os hormônios sexuais são produzidos a partir do colesterol e podem ser classificados em três grupos principais: hormônios sexuais femininos, ou estrógenos; hormônios sexuais masculinos, ou andrógenos e, hormônios da gravidez, ou progestógenos¹¹.

Dentre os hormônios sexuais, os estrógenos vêm recebendo maior atenção por serem compostos extremamente ativos biologicamente e estão relacionados à etiologia de vários tipos de cânceres¹². Os estrógenos naturais 17β-estradiol (E₂), estriol (E₃), estrona (E₁) e o sintético 17α-etinilestradiol (EE₂), desenvolvido para uso médico em terapias de reposição e métodos contraceptivos, são os que despertam maior preocupação, tanto pela potência como pela quantidade contínua introduzida no ambiente. Estes hormônios possuem a melhor conformação reconhecida pelos receptores e, portanto, resultam em respostas máximas, sendo considerados como responsáveis pela maioria dos efeitos disruptores desencadeados pela disposição de efluentes¹³. A Figura 1 mostra a estrutura química destes compostos, sendo que algumas de suas características importantes estão sintetizadas na Tabela 1.

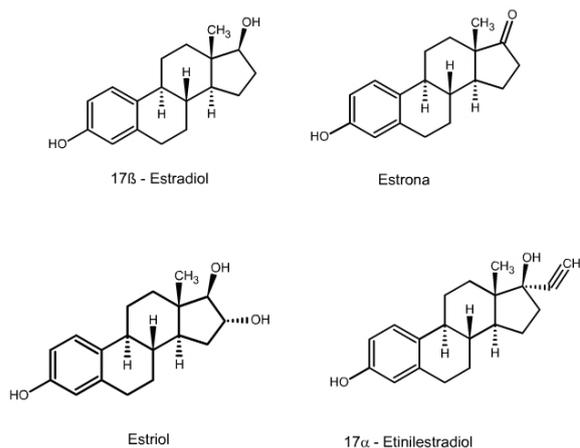
Os hormônios excretados através da urina e fezes seguem para a rede coletora, adentrando depois ao ambiente. O lançamento de efluentes *in natura* ou mesmo processados são as principais vias de contaminação do ambiente aquático, seja pelo déficit de infra-estrutura em saneamento, seja pela ineficiência (tecnológica e/ou operacional) das estações de tratamento¹⁵. Apesar de possuírem meia-vida relativamente curta quando comparados a outros compostos orgânicos (como alguns pesticidas), os estrógenos naturais são continua-

*e-mail: reisfo@yahoo.com.br

Tabela 1. Características dos principais estrógenos. Adaptada das ref. 8 e 14

Nome comum	CAS-no	Fórmula	γ_{sat} ($\mu\text{g L}^{-1}$ 25 °C)	Log K_{ow}	Pressão de Vapor (mm Hg)	K_{oc}	Meia-Vida (dias)
17 β -Estradiol	50-28-2	$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_2$	12960	4,01	$2,3 \times 10^{-10}$	3300	2 - 3; 0,2 - 9
Estrona	53-16-7	$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_2$	12420	3,13	$2,3 \times 10^{-10}$	4882	2 - 3
Estriol	50-27-1	$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_3$	13250	2,45	$6,7 \times 10^{-15}$	1944	NR
17 α -Etinilestradiol	57-63-6	$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_2$	483	3,67	$4,5 \times 10^{-11}$	4770	4 - 6

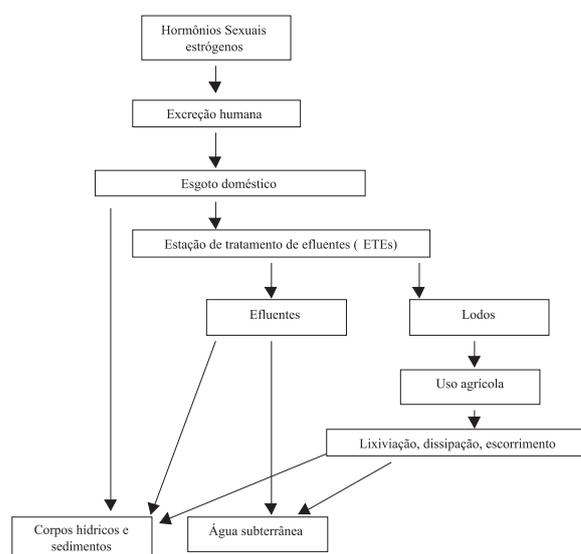
γ_{sat} : solubilidade em água; K_{ow} : coeficiente de partição octanol/água; K_{oc} : constante de sorção; NR: não relatado.

**Figura 1.** Estruturas dos principais hormônios estrógenos

mente introduzidos no ambiente (Tabela 2), o que lhes concede um caráter de persistência. Estudos relatam que até 40% das doses ministradas de estrógenos sintéticos podem ser disponibilizadas para o ambiente¹⁶. A Figura 2 exemplifica o modo de entrada destes contaminantes para os ecossistemas. Embora grande parte dos estrógenos seja metabolizada e excretada na forma inativa, conjugada como glicuronídeos e sulfatos¹⁷, a ação de enzimas produzidas por bactérias comumente encontradas em áreas de despejo de efluentes prontamente os biotransformam em compostos biologicamente ativos e passíveis de desencadear efeitos deletérios¹⁸.

O destino dos estrógenos no ambiente depende de suas características físicas e químicas e das propriedades do meio receptor. As inúmeras variáveis que atuam em conjunto no ambiente aquático, como temperatura, turbidez, pH, alcalinidade, oxigênio dissolvido, radiação, matéria orgânica e concentração de diversas outras substâncias, tornam a tarefa de modelar o comportamento destes compostos bastante complexa. Devido a sua lipofilicidade e baixa volatilidade, o processo de sorção em sedimentos suspensos pode ser um fator significativo na redução dos estrógenos na fase aquosa¹⁹. Porém, em estudos de partição entre sedimento e água simulan-

do várias condições ambientais, Bowman *et al.*²⁰ concluíram que embora as partículas influenciem no comportamento ambiental dos estrógenos, a sorção é relativamente limitada, com a maioria permanecendo na fase aquosa. Já Lai *et al.*¹⁹ sugeriram que estrógenos dissolvidos podem rapidamente se tornar adsorvidos aos sólidos em suspensão, indicando que a competição pelos sítios de ligação com outros compostos mais hidrofóbicos e a respectiva saturação destes sítios são os responsáveis pela proporção de estrógenos que permanecem na fase aquosa. São necessárias investigações mais detalhadas para se entender a dinâmica de distribuição dos hormônios nos diversos ambientes em que são inseridos.

**Figura 2.** Representação esquemática da principal via de entrada de disruptores endócrinos hormonais em sistemas aquáticos. Adaptada da ref. 22

TÉCNICAS ANALÍTICAS

A análise em nível de traços de compostos orgânicos em água pode ser considerada como um dos maiores desafios da química

Tabela 2. Quantidade média de estrógenos diariamente excretada na urina de humanos. Adaptada da ref. 21

Estrógeno	Excreção ♂ ($\mu\text{g}/24$ h)	Excreção ♀ menstruação ($\mu\text{g}/24$ h)	Excreção ♀ gravidez ($\mu\text{g}/24$ h)	Excreção ♀ menopausa ($\mu\text{g}/24$ h)
17 β -Estradiol	1,6	3,5	259	2,3
Estrona	3,9	8,0	600	4,0
Estriol	1,5	4,8	6000	1,0

analítica. A determinação de hormônios estrógenos no ambiente constitui-se em tarefa difícil, primeiro, devido à complexidade das matrizes ambientais e, segundo, por causa de sua baixa concentração (na ordem de ng L^{-1}), porém fisiologicamente ativa²³.

Na maioria das análises que envolvem amostras “reais”, é necessário o enriquecimento substancial do analito para se isolar os compostos alvos da matriz e atingir os limites de detecção e quantificação requeridos. Um procedimento analítico típico inclui, portanto, vários passos para preparação da amostra, tais como filtração, extração, purificação e evaporação. Se a determinação final for feita por cromatografia gasosa, hidrólise e derivatização também são, freqüentemente, necessárias²⁴.

Em análises de água, até alguns anos, na etapa de preparação das amostras era comum se fazer a extração dos componentes de interesse utilizando a extração líquido-líquido. Porém, esse tipo de extração, além de ser uma técnica tediosa, requer grandes volumes de solventes orgânicos, apresenta custo elevado e difícil automação²⁵.

Em meados da década de 70, visando a eliminação desses problemas, uma nova técnica foi introduzida, a qual tem sido denominada extração em fase sólida (“SPE: Solid Phase Extraction”)²⁵, onde grupos funcionais orgânicos hidrofóbicos são quimicamente ligados a uma superfície sólida, como sílica. Um exemplo comum é a ligação do grupo C_{18} com a sílica, sendo que esse grupo interage com compostos orgânicos hidrofóbicos pela ação das forças de van der Waals e, dessa forma, são extraídos da fase aquosa²⁶. Uma alternativa ao uso de cartuchos em extração em fase sólida foi o desenvolvimento de discos constituídos de fases estacionárias cromatográficas imobilizadas com material inerte como PTFE (politetrafluoretileno) ou fibra de vidro. Os discos são preferidos quando são manipulados²⁵ grandes volumes de amostras.

Segundo Barceló *et al.*²⁴, a extração de estrógenos e progestógenos em água é feita usualmente pela extração em fase sólida (SPE) em discos, ou mais freqüentemente cartuchos, sendo o adsorvente mais amplamente empregado o octadecilsilano (C_{18}) quimicamente ligado à sílica e, em menor escala, com sorventes poliméricos de carbono preto grafitizado (GCB).

Para determinação de EDCs, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) tem sido a técnica mais comumente empregada, uma vez que apenas há poucos anos a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM) tem ganhado popularidade²⁷.

O pré-requisito necessário para análise em cromatografia gasosa é que o analito de interesse seja volátil e termicamente estável. Quando não for o caso, a derivatização pode ser usada para superar esta limitação. Tradicionalmente, a cromatografia gasosa necessita do uso de derivados para determinar compostos estrógenos. As desvantagens da derivatização são o trabalho intensivo de laboratório e a possibilidade de redução da recuperação do analito, pois a hidrólise dos conjugados para estrógenos livres, via derivatização, pode compor erros nos estágios de recuperação, extração e quantificação, devido à baixa eficiência no passo de hidrólise²⁸. O tempo de consumo na etapa de derivatização e a possível perda do analito têm levado a considerar a técnica de cromatografia líquida como preferida para determinação de estrógenos.

A cromatografia líquida tem várias vantagens para análise de compostos orgânicos em água. Uma delas é que os compostos voláteis representam uma pequena fração de compostos orgânicos contidos em água e esgotos. A maior parte do carbono está presente como compostos não voláteis, que podem ser diretamente analisados pela cromatografia líquida e não pela gasosa. Isto é especialmente verdadeiro para esgotos, os quais contêm muito material húmico e compostos orgânicos polares, tais como carboidratos²⁹.

De acordo com vários autores, os detectores e acoplamentos de detectores mais empregados para análise de hormônios pela técnica de CLAE são: eletroquímico^{30,31}, fluorescência³², espectrômetro de massas^{24,27,28,31,33} - CLAE-EM, CLAE-EM-EM, ultravioleta com varredura de diodo²³ e ultravioleta com varredura de diodo acoplado a espectrômetro de massas^{23,34}.

TOXICIDADE

Os organismos podem ser considerados como um imenso complexo de reações químicas ininterruptas, desde o zigoto, o embrião, o feto, a fase jovem e, finalmente, a idade adulta³⁵. Durante esta evolução, as reações são constantemente alteradas à medida que inúmeros agentes químicos adentram ao sistema, como alimentos, bebidas, medicamentos, drogas, gases, etc. A Figura 3 mostra a ação dos estrógenos sobre os mecanismos de controle do sistema endócrino, desencadeando perturbações em cada um dos aspectos controlados pelo sistema, incluindo a homeostase que é fundamental para manutenção do equilíbrio metabólico dos organismos.

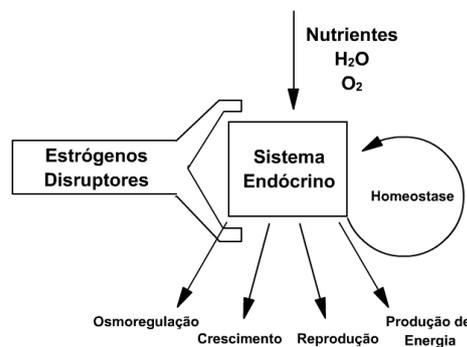


Figura 3. Representação esquemática da interação tóxica dos estrógenos com as funções coordenadas pelo sistema endócrino. Adaptada da ref. 36

Ecotoxicologia

Os efeitos desencadeados pelos hormônios dispostos no ambiente atingem desde microinvertebrados até grandes vertebrados, sendo amplamente relatados na literatura científica e considerados como uma questão de âmbito global³⁷. Agências ambientais de diversos países, assim como organizações internacionais, desenvolvem programas e planos de pesquisa que versam sobre o tema³⁸.

Segundo Manahan³⁹, a principal preocupação ecotoxicológica com estas substâncias implica em sua evidente capacidade de afetar a reprodução das espécies e interferir no desenvolvimento saudável da prole. Assim, o estágio do desenvolvimento em que a exposição ocorre é particularmente importante pois, em espécies aquáticas onde a fase embrio-larval é crítica, danos permanentes podem ser provocados em vários órgãos e sistemas⁴⁰.

De acordo com Erickson¹⁵, o dirigente da seção de química ambiental da USEPA, Christian Daughton, afirma que a concentração de EDCs no ambiente é apenas um dos aspectos do problema, sendo imprescindível o conhecimento da sua respectiva potência, pois muitos deles são preocupantes em qualquer concentração mensurável. Assim, as curvas de dose-resposta dos hormônios ambientais diferem das normalmente associadas a outros agentes tóxicos (como ex., metais), tendo respostas expressivas geradas em concentrações extremamente baixas⁴¹. A interpretação do conceito

de limiar de segurança é inapropriado para este grupo de poluentes. Da Matta e Azevedo⁴² salientam a inexistência de consenso sobre a metodologia adequada para abordar o risco gerado por substâncias onde para o efeito crítico não é passível se estabelecer limites.

Inúmeros são os efeitos desencadeados pelos hormônios sexuais sobre a biota³⁹: alterações nas taxas de fecundidade, fertilização, eclosão; modificações comportamentais (agressividade, movimentação); histopatologias (fígado, gônadas, rins); imunodepressão; imposex (desenvolvimento de características sexuais femininas em machos ou oposto) e, inibição do desenvolvimento dos órgãos sexuais e reversão sexual. Os vários efeitos manifestam-se após interação entre agentes e receptores bioquímicos. Portanto, as respostas bioquímicas são perceptíveis antes que os efeitos sejam observáveis em níveis de organização superior, como em populações, comunidades e ecossistemas. Este cenário levou à busca de “sinais” prematuros de advertência, os biomarcadores⁴³. Biomarcadores são quaisquer respostas biológicas decorrentes de reações químicas medidas em nível sub-individual, tanto dentro do organismo (enzimas, proteínas, hormônios, aminoácidos, material genético etc.) como em seus produtos (urina, fezes, pêlos etc.), indicando um desvio das condições normais não detectadas em organismos intactos⁴⁴.

A determinação da proteína vitelogenina (VTG) em organismos aquáticos, principalmente peixes, tem sido bastante utilizada na investigação por contaminantes estrogênicos⁴⁵. A vitelogenina é uma fosfolipoproteína sintetizada por todas as fêmeas de ovíparos durante o ciclo reprodutivo; é produzida no fígado e secretada na corrente sanguínea, onde é transportada até os ovários, acumulando-se nos ovócitos em crescimento para ser, então, utilizada como precursora das reservas nutricionais necessárias para o desenvolvimento subsequente dos embriões⁴⁶. Em indivíduos imaturos ou em machos, a codificação do gene para esta proteína não existe ou é muito fracamente expressada. Assim, a presença desta proteína no sangue destes organismos representa um biomarcador de exposição, pois sua síntese depende da presença de xenoestrógenos (Figura 4).

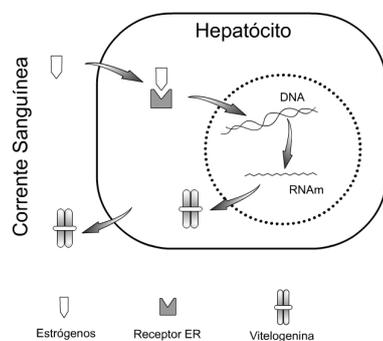


Figura 4. Representação esquemática simplificada da seqüência de processos que leva à síntese do biomarcador de exposição VTG em peixes machos

Além de proporcionar uma avaliação qualitativa de exposição a agentes estrogênicos, a própria produção da VTG no gênero masculino envolve prejuízos, ainda que indiretos, para o desenvolvimento dos organismos. A sobrecarga das funções hepáticas e a ruptura metabólica, devido ao desvio na produção de proteínas essenciais em detrimento da produção da VTG, juntamente com a baixa resistência imunológica e retardo no crescimento são alguns dos possíveis danos apontados na literatura^{46,47}.

TIE: testes de toxicidade e química analítica

A avaliação e identificação da toxicidade, conhecida como TIE (“Toxicity Identification Evaluation”), é uma metodologia que combina Química e Biologia em programas de monitoramento. O TIE utiliza procedimentos de fracionamento para distinguir quais entre as várias classes de compostos que compõem um efluente ou amostra ambiental são responsáveis por gerar toxicidade⁴⁸. A técnica é estruturada em três fases sequenciais: caracterização, identificação e confirmação da toxicidade⁴⁹. Diversos procedimentos são empregados para separar os constituintes responsáveis pela toxicidade⁴⁸: filtração, quelação (EDTA), aeração, extração em fase sólida (colunas C_{18}) e alterações de pH são algumas entre as possibilidades de manipulação. Mudanças na toxicidade após estes tratamentos são indicativas da contribuição das diferentes classes de compostos.

Routledge⁵⁰ descreveu a aplicação de técnica para identificação de substâncias endócrinas ativas. Através de extração em fase sólida (C_{18}) e eluição seletiva, removeu compostos orgânicos de efluentes complexos e os identificou usando de técnicas cromatográficas, sendo que a atividade estrogênica avaliada por meio de ensaios com levedura *in vitro* indicou os hormônios sexuais estrógenos como os principais responsáveis pelos efeitos atribuídos aos efluentes domésticos. Gomes *et al.*²⁸, em revisão sobre os métodos de determinação de disruptores endócrinos em amostras aquosas, indicaram uma série de trabalhos que aplicaram esta estratégia, descrevendo também uma abordagem coerente da aplicação do TIE em estudos com substâncias potencialmente estrogênicas.

PERSPECTIVAS: ECOLOGIA E SAÚDE PÚBLICA

O lançamento de substâncias hormonalmente ativas em corpos hídricos, mesmo em baixas concentrações, pode acarretar sérios impactos sobre a dinâmica e estrutura das populações aquáticas⁵¹. Estudos importantes realizados no Canadá⁵² indicaram, pela primeira vez, que concentrações do estrogênio 17 α -etinilestradiol, iguais as encontradas nas proximidades de lançamentos de efluentes (5-6 ng L⁻¹) levaram ao colapso as populações de peixes existentes em lagos experimentais. Como nos ecossistemas existem intrincadas teias tróficas, o desequilíbrio provocado pela extinção de uma espécie-chave, por mais resiliente que seja o sistema, pode gerar mudanças significativas e/ou imprevisíveis em razão das propriedades emergentes. É importante salientar que a literatura^{53,54} relata concentrações de 17 α -etinilestradiol em efluentes desde 0,5 até 273 ng L⁻¹, em razão do tipo de tratamento empregado e do local amostrado.

Além de seu valor intrínseco, as espécies selvagens fazem parte das estruturas e funções dos ecossistemas que suportam as atividades humanas. Aliás, ecologicamente os humanos são apenas uma entre as milhares de espécies que habitam o planeta. A postura que desvincula o Homem Natural e valoriza apenas a “tecnosfera” é a grande responsável por nossa sociedade altamente industrializada e poluidora.

Em 1987, o jornal da Associação Médica Americana (JAMA) já mencionava a prescrição de estrogênios para cerca de 200 tratamentos terapêuticos⁵⁵. Mais recentemente, Weeb⁵⁶ citou que em 2002 os médicos americanos prescreveram uma média de 10,6 medicamentos (de diferentes classes) para cada habitante. Sanderson *et al.*⁵⁷ demonstraram através de estudos de toxicidade que, entre as principais classes de medicamentos encontradas em amostras ambientais, os hormônios sexuais estão entre os que podem induzir efeitos mais severos, tanto para humanos quanto para a biota.

Outro dado relevante foi levantado por Zlidar *et al.*⁵⁸, em que mais de 620 milhões de mulheres casadas ao redor do mundo fazem uso de métodos contraceptivos, estando as pílulas anticoncepcionais e os injetáveis entre os mais utilizados. Estes fatos evidenciam as altas taxas de uso e consequente introdução desses compostos no ambiente.

O estabelecimento de umnexo causal considerando o ambiente em doenças crônicas é uma tarefa complexa, devido às inúmeras exposições a que os seres humanos são submetidos diariamente. No entanto, questões relevantes relacionadas aos EDCs, apesar de ainda necessitarem de processos rigorosos e exaustivos de investigação científica, não podem ser subestimadas. A antecipação da puberdade⁵⁹ e o declínio na qualidade do sêmen⁶⁰ durante o último século são temas centrais nesta discussão. A existência de sítios receptores para estrógenos em diversos tecidos⁶¹ e a capacidade destes compostos atuarem de modo sinérgico⁶² reforçam a preocupação existente com a disfunção endócrina.

Há muito tempo, uma nova postura do Homem frente ao ambiente se faz necessária, com intuito de preservar a integridade da vida. Um dos pontos fundamentais neste novo paradigma é em relação à saúde, que deixa de ser “apenas” um direito para se transformar em uma responsabilidade individual e sócio-ambiental.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP pela concessão da bolsa de doutoramento processo 03/05772-0. Ao CNPq pela concessão de bolsa de mestrado. Ao biólogo D. S. Barbosa pelo trabalho computacional nas ilustrações.

REFERÊNCIAS

- Mackay, D.; *Water Sci. Technol.* **1982**, *14*, 5.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA); *Research Plan for Endocrine Disruptors*, Washington, 1998.
- European Workshop on the Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife*, Weybridge, 1996.
- <http://e.hormone.tulane.edu/learning/effects.html>, acessada em Janeiro 2005.
- Thomas, J. A.; *Int. J. Toxicol.* **1998**, *17*, 129; Jørgensen, S. E.; Sørensen, B. H.; *Chemosphere* **2000**, *40*, 691; Kolpin, D. W.; Furlong, E. T.; Meyer, M. T.; Thurman, E. M.; Zaugg, S. D.; Barber, L. B.; Buxton, H. T.; *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 1202.
- Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC); *Endocrine Disruptors and Modulators*, Pensacola, 2000.
- Brönmark, C.; Hansson, L. A.; *Environ. Conserv.* **2002**, *29*, 290.
- Lintelmann, J.; Katayama, A.; Kurihara, N.; Shore, L.; Wenzel, A.; *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, 631.
- <http://www.ec.gc.ca>, acessada em Novembro 2000; Raphael, J. W.; *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2002**, *36*, 118; McGovern, P.; McDonald, H. S.; *WE&T* **2003**, *15*, 35.
- Simmonds, R. J.; *Chemistry of Biomolecules: An Introduction*, The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1992.
- Solomons, G.; Fryhle, C.; *Química Orgânica*, 7ª ed., LCT: Rio de Janeiro, 2000.
- Dos Reys, L. L.; *RFML* **2001**, *6*, 213.
- Gray, T. P. R.; Jobling, S.; Morris, S.; Kelly, C.; Kirby, S.; Janbakhsh, A.; Harries, J. E.; Waldock, M. J.; Sumpter, J. P.; Tyler, C. R.; *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*, 1521; Shaw, I.; McCully, S.; *Int. J. Food Sci. Technol.* **2002**, *37*, 471; Suzuki, K.; Hirai, H.; Murata, H.; Nishida, T.; *Water Res.* **2003**, *37*, 1972; Aerni, H. R.; Kobler, B.; Rutishauser, B. V.; Wettstein, F. E.; Fischer, R.; Giger, W.; Hungerbühler, A.; Marazuela, M.D.; Peter, A.; Schönenberger, R.; Vögeli, A.C.; Suter, M.J.F.; Eggen, R. I. L.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 688.
- Tabak, H. H.; Blomhuff, R. N.; Bunch, R. L.; *Dev. Ind. Microbiol.* **1981**, *22*, 497; Jürgens, M. D.; Holthaus, K. I. E.; Johnson, A. C.; Smith, J. J. L.; *Environ. Toxicol. Chem.* **2002**, *21*, 480; Carballa, M.; Omil, F.; Lema, J. M.; Llompert, M.; Jares, C. G.; Rodríguez, I.; Gómez, M.; Ternes, T.; *Water Res.* **2004**, *38*, 2918.
- Erickson, B. E.; *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 141A.
- Johnson, A. C.; Williams, R. J.; *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, 3649.
- Arie, W. M. Y.; Arie, M. H. A.; Da Fonseca, A. M.; Halbe, H. W.; Bagnoli, V. R. Em *Estrógenos em Ginecologia Endócrina Manual de Normas*; Da Fonseca, A. M.; Bagnoli, V. R.; Halbe, H. W.; Pinotti, J. A., eds.; Roca: São Paulo, 2004.
- Tyler, C. R.; Routledge, E. J.; *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*, 1795; Panter, G. H.; Thompson, R. S.; Beresford, N.; Sumpter, J. P.; *Chemosphere* **1999**, *38*, 3579.
- Lai, K. M.; Johnson, K. L.; Scrimshaw, M. D.; Lester, J. N.; *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*, 3890.
- Bowman, J. C.; Readman, J. W.; Zhou, J. L.; *Environ. Geochem. Health* **2003**, *25*, 63.
- Johnson, A. C.; Belfroid, A.; Di Corcia, A.; *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*, 163.
- Velagaletti, R. R.; *Drug Infor. J.* **1995**, *250*, 565.
- Barceló, D.; Alda, M. J. L.; *J. Chromatogr. A* **2001**, *911*, 203.
- Barceló, D.; Alda, M. J. L.; Díaz-cruz, S.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000*, 503.
- Lanças, F. M.; *Extração em Fase Sólida (SPE)*, Rima: São Carlos, 2004.
- Christian, G. D.; *Analytical Chemistry*, Wiley: New York, 1994.
- Ingrand, V.; Herry, G.; Beausse, J.; Roubin, M.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *1020*, 99.
- Gomes, L. R.; Scrimshaw, D. M.; Lester, J. N.; *Trends Anal. Chem.* **2003**, *22*, 697.
- Grob, R. L.; *Chromatographic Analysis of the Environment*, 2nd ed., Dekker: New York, 1983.
- Shimada, K.; Tanaka, T.; Nambara, T.; *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1981**, *223*, 33; Reid, J. J.; Stitzel, R. E.; Head, R. J.; *J. Pharmacol. Methods* **1985**, *14*, 25; Shimada, K.; Nagashima, E.; Ori, I.; Nambara, T.; *J. Pharmacol. Biomed. Anal.* **1987**, *5*, 361; Fernández, N. J. J.; García, M. J.; Diez, M. T.; *J. Chromatogr. Biomed. Applic.* **1993**, *619*, 143.
- Giese, R. W.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000*, 401.
- Gatti, R.; Gotti, R.; Gioia, M. G.; Cavrini, V.; *J. Pharmacol. Biomed. Anal.* **1998**, *17*, 337; Gatti, R.; Gioia, M. G.; Di Pietra, A. M.; Cavrini, V.; *J. Pharmacol. Biomed. Anal.* **1998**, *18*, 187; Novakovi, J.; Tvrzická, E.; Pacáková, V.; *J. Chromatogr. A* **1994**, *678*, 359; Matsumoto, K.; Tsukahara, Y.; Uemura, T.; Tsunoda, K.; Kume, H.; Kawasaki, S.; Tadano, J.; Matsuyua, T.; *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2002**, *773*, 135; De Boer, T.; Ojens, D.; Muntendamb, A.; Meulman, E.; van Oostijen, M.; Ensing, K.; *J. Pharmacol. Biomed. Anal.* **2004**, *34*, 671; Mao, L.; Sun, C.; Zhang, H.; Li, Y.; Wu, D.; *Anal. Chim. Acta* **2004**, *522*, 241.
- Isobe, T.; Shiraishi, H.; Yasuba, M.; Shinoba, A.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *984*, 195; Brossa, L.; Pocurull, E.; Borrull, F.; Marcé, R. M.; *Chromatographia* **2004**, *59*, 419; Lågana, A.; Bacaloni, A.; Leva, I.; Faberi, A.; Fago, G.; Marino, A.; *Anal. Chim. Acta* **2004**, *501*, 79.
- Barceló, D.; Alda, M. J. L.; *J. Chromatogr. A* **2001**, *938*, 148.
- Corwin, H.; Leo, A.; *Exploring QSAR: Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology*, ACS Professional Reference Book: Washington, 1999.
- Brouwer, A.; Murk, A. J.; Koeman, J. H.; *Func. Ecology* **1990**, *4*, 275.
- International Programme on Chemical Safety (IPCS); *Global Assessment of the State-of-Science of Endocrine Disruptors*, Geneva, 2002.
- <http://www.nihs.gov/jhs/endocrine/index.htm>, acessada em Outubro 2001; <http://www.who.int/pcs/>, acessada em Março 2003; <http://endocrine.ei.jrc.it>, acessada em Março 2003; <http://oecd.org/ehs/endocr.htm>, acessada em Maio 2003.
- Manahan, S.E.; *Toxicological Chemistry and Biochemistry*, 3rd ed., Lewis Publishers: Boca Raton, 2003.
- Medical Research Council's Institute for Environment and Health (MRC); *Appraisal of Test Methods for Sex-Hormone Disrupting Chemicals Capable of Affecting the Reproductive Process*, London, 1998.
- Lathers, C. M.; *J. Clin. Pharmacol.* **2002**, *42*, 7.
- Da Matta, C. A. A.; Azevedo, F. A. Em *As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia*; Da Matta, C. A. A.; Azevedo, F. A., coord.; Rima: São Carlos/Intertox: São Paulo, 2003, cap. 5.
- van der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N. P. E.; *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2003**, *13*, 57.
- Adams, W. J. Em *Aquatic Toxicology Testing Methods in Handbook of Ecotoxicology*; Hoffman, D. J.; Rattner, B. A.; Burton Jr., G. A.; Cairns Jr., J., eds.; Lewis Publishers: Boca Raton, 1995, cap. 3; van Gestel, C. A. M.; van Brummelen, T. C.; *Ecotoxicology* **1996**, *5*, 217.
- Sumpter, J. P.; Jobling, S.; *Environ. Hlth. Perspect.* **1995**, *103*, 173; Tyler, C. R.; van der Eerden, B.; Jobling, S.; Panter, G.; Sumpter, J. P.; *J. Comp. Physiol. B* **1996**, *166*, 418; Hansen, P. D.; Dizer, H.; Hock, B.; Marx, A.; Sherry, J.; McMaster, M.; Blaise, C.; *Trends Anal. Chem.* **1998**, *17*, 448;

- Allner, B.; Wegener, G.; Knacker, T.; Allner, P. S.; *Sci. Total Environ.* **1999**, *233*, 21; Takemura, A.; Kim, B. H.; *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.* **2001**, *129*, 641; <http://www.comparative-hepatology.com/content/2/1/4>, acessada em Fevereiro 2005.
46. Institut National de L'environnement Industriel et des Risques (INERIS); *Annual and Scientific Report*, Paris, 2000.
47. Solé, M.; Castillo, M.; Alda, M. J. L.; Porte, C.; Barceló, D.; *Analisis* **2000**, *28*, 783.
48. Swartz, R. C.; Di Toro, D. M. Em *Sediments as Complex Mixtures: An Overview of Methods to Assess Ecotoxicological Significance in Ecological Risk Assessment of Contaminated Sediments*; Ingersoll, C. G.; Dillon, T.; Biddinger, G. R., eds.; Setac Press: Pensacola, 1997, cap. 16.
49. Ankley, G. T.; Berigan, S. M. K.; *J. Aqua. Ecosys. Hlth.* **1995**, *4*, 133.
50. Routledge, J. E.; *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, 2461.
51. Folmar, L. C.; Hemmer, M.; Hemmer, R.; Bowman, C.; Kroll, K.; Denslow, N. D.; *Aquat. Toxicol.* **2000**, *49*, 77.
52. Pelley, J.; *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 313A.
53. Bila, D. M.; Dezotti, M.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 523.
54. Nash, J. P.; Kime, D. E.; van der Ven, L. T. M.; Wester, P. W.; Brion, F.; Maack, G.; Allner, P. S.; Tyler, C. R.; *Environ. Hlth. Perspect.* **2004**, *112*, 1725.
55. Palmund, I.; *J. Psychosom. Obst. Gynec.* **1996**, *17*, 71.
56. Weeb, C. E.; *IEEE Spectrum* **2004**, *41*, 37.
57. Sanderson, H.; Brain, R. A.; Johnson, D. J.; Wilson, C. J.; Solomon, K. R.; *Toxicology* **2004**, *203*, 27.
58. <http://www.populationreports.org/m17/>, acessada em Novembro 2003.
59. Pike, M. C.; Ross, R. K.; *Br. Med. Bull.* **1984**, *40*, 351; Multigner, L.; Oliva, A.; *Cad. Saúde Pública* **2002**, *18*, 403.
60. Altken, R. J.; Koopman, P.; Lewis, S. E. M.; *Nature* **2004**, *432*, 48.
61. Mueller, S. O.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 582; Jacobs, M. Em *Pesticide Action Network UK* 2001, (briefing 1), 1; Shughrue, P. J.; Merckenthaler, I.; *Neuroendocrinol.* **2000**, *21*, 95; Ahmed, S. A.; *Toxicology* **2000**, *150*, 191.
62. Rajapakse, N.; Silva, E.; KortenKamp, A.; *Environ. Hlth. Perspect.* **2002**, *110*, 917; Silva, E.; Rajapakse, N.; KortenKamp, A.; *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 1751..

4.2 2º Artigo

Título: POLUENTES EMERGENTES COMO DESREGULADORES
ENDÓCRINOS

Periódico: Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology

Poluentes Emergentes como Desreguladores Endócrinos

R. W. REIS FILHO,¹ R. LUVIZOTTO-SANTOS² & E. M. VIEIRA^{3*}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil

²Programa de Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil

³Departamento de Física e Química Molecular, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil

(Received March 22, 2007; Accepted January 7, 2007)

RESUMO

Poluentes emergentes, como produtos farmacêuticos, hormônios naturais e sintéticos, pesticidas, substâncias tensoativas, polímeros de baixa massa molecular, produtos de uso veterinário, solventes e outros contaminantes orgânicos presentes em efluentes municipais e industriais, podem atuar como desreguladores endócrinos (DE). As ações de alguns destes compostos sobre a biota acarretam disfunções reprodutivas e estudos apontam que também podem ser indutores de cânceres. Em relação aos seres humanos, embora ainda não tenham sido estabelecidas relações de causa e efeito conclusivas, várias pesquisas indicam a possibilidade de que a maior incidência de distúrbios como defeitos de nascimento, alterações comportamentais e neurológicas, deficiência imunológica, puberdade acelerada, qualidade do sêmen e cânceres tenham relação com poluentes emergentes com ação desreguladora endócrina. O problema se agrava nos países que buscam o desenvolvimento, onde muitas vezes a legislação ambiental é deficiente e não se contemplam substâncias com potencial de alteração endócrina. Além disso, a falta de infra-estrutura de saneamento básico existente nesses países agrava esse cenário. No Brasil, por exemplo, aproximadamente 80% dos municípios não possuem estações de tratamento de esgoto. Conseqüentemente, os poluentes emergentes adentram os ecossistemas através de diversas vias, gerando ameaça aos organismos. Trata-se, assim, de uma questão que pede urgência em atenção, discussão e gerenciamento.

Palavras-chave: desreguladores endócrinos, ecotoxicologia, poluentes emergentes, saúde pública.

ABSTRACT

Emerging pollutants as endocrine disruptors

Emerging pollutants, such as pharmaceutical products, natural and synthetic hormones, pesticides, tensoactive substances, low-molecular-mass polymers, veterinary products, solvents and other organic contaminants present in urban and industrial effluents may act as endocrine disruptors (ED). The presence of such chemical species in the biota can lead to reproductive dysfunction and studies have shown they may also cause cancer. For humans, despite the fact that conclusive cause-and-effect relations have not yet been established, several published papers have indicated that a wide range of disorders, such as inborn impairments, behavioral and neurological alterations, immune deficiency, accelerated puberty, quality of semen and cancers (thyroid, breast, ovary, prostate, testicles) can be credited to endocrine disruptors emerging pollutants. The problem is more accentuated in developing countries, where environmental legislation is often poor, out of date and, as result does not consider substances with endocrine disrupting potential. In addition, the lack of basic sanitation aggravates the situation. In Brazil, for instance, approximately 80% of urban centers do not have any form of sewage treatment. Consequently, emerging pollutants enter the ecosystem through several paths generating threat to biota and, because of this, it represent an area which requires urgent attention, discussion and management.

Key words: ecotoxicology, emerging pollutants, endocrine disruptors, public health.

*Corresponding author: Eny Maria Vieira, e-mail: eny@oqsc.usp.

INTRODUÇÃO

A qualidade ambiental é a base para a preservação da vida das futuras gerações, sendo a água a substância que sustenta e permite a estruturação da sociedade humana. Supõe-se que a cada vinte anos dobram os volumes de água consumida pela humanidade (De Freitas, 2000), portanto, é premente a necessidade de implantar nova mentalidade de gerenciamento deste recurso, cujo valor de uso e o valor intrínseco (de existência) alcancem equilíbrio.

A proteção das águas, quanto aos níveis de desreguladores endócrinos (DE), se insere nesta nova postura, que visa garantir suas qualidades física e química, com implicações diretas na saúde humana e na sustentabilidade da biodiversidade.

Vários termos foram identificados como sinônimos para os agentes que atuam sob o sistema endócrino. Alguns destes são: xenoestrógenos, xeno-hormônios, perturbadores endócrinos, estrógenos ambientais, moduladores endócrinos, hormônios ambientais, agentes hormonalmente ativos e desreguladores endócrinos. Embora o National Research Council (EUA) recomende a aplicação do termo *agentes hormonalmente ativos* (NAS, 1999), essa denominação pode gerar confusão pois o acrônimo inglês é o mesmo usado para ácidos haloacéticos (haloacetic acid – HAA), um subproduto gerado na desinfecção da água e classificado como contaminante (Sawyer *et al.*, 2003). Como a grande maioria dos trabalhos consultados apresenta a designação de *desreguladores endócrinos*, optou-se pela utilização do termo e de sua sigla (DE) para efeito de padronização.

A primeira hipótese sobre o efeito de DE foi levantada no início da década de 1980, com a observação de características femininas em machos de aves coloniais da região dos Grandes Lagos (América do Norte) expostos ao praguicida organoclorado DDT (SETAC, 2000), sendo o mesmo fenômeno encontrado em populações de jacarés do lago Apopka, no estado da Flórida (EUA). Na Europa, por volta da mesma época, pescadores britânicos relataram a ocorrência de características

sexuais incomuns (intersexo e/ou hermafroditismo) em peixes da espécie *Rutilus rutilus* que habitavam uma lagoa a jusante do ponto de descarga de uma estação de tratamento de efluentes (Sweeting, 1981, *apud* Tyler & Routledge, 1998).

Apesar dessas indicações anteriores, somente a partir da segunda metade dos anos 90 os efeitos provocados pelos DE começaram a ser mais investigados. Portanto, a utilização do termo “poluentes emergentes” refere-se não necessariamente às suas descobertas recentes, e sim ao fato de serem um grupo em especial que tem características peculiares que os tornam ambientalmente importantes em razão dos usos e níveis crescentes de utilização e de contaminação. Portanto, alguns grupos de compostos que não são considerados problemáticos no presente podem se mostrar altamente indesejáveis no futuro (Bruchet *et al.*, 2002). De fato, diversas substâncias químicas que estão presentes em efluentes urbanos e industriais e que hoje são considerados poluentes emergentes, como fármacos, hormônios sintéticos, alguns pesticidas, retardantes de fogo, compostos perfluorados, etc. (Barceló, 2003), têm demonstrado ação desreguladora endócrina (Tabela 1).

Em função da ampla gama de substâncias envolvidas, os esforços em investigação requeridos são enormes. A agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (USEPA) cita aproximadamente 87.000 substâncias que deveriam ser avaliadas quanto aos seus potenciais efeitos sobre o sistema endócrino (Sadik & Witt, 1999). O Parlamento Europeu, através da sua diretoria geral de meio ambiente (DGENV), apresentou uma lista de 560 compostos cujas interferências têm sido comprovadas em sistemas hormonais (Serrano *et al.*, 2002), sendo o rol continuamente revisado e ampliado à medida que novos dados estão disponíveis.

Cabe destacar que recentemente foram instituídos projetos de longo prazo em diversos países com o intuito de compreender os efeitos desencadeados pelos DE sobre várias espécies de comunidades aquáticas continentais e marinhas (NIBB, 2001¹; IPCS, 2002).

Tabela 1 – Substâncias emergentes que têm sido reportadas como desreguladores endócrinos ou com potencial de ação desreguladora (dados compilados de McGovern & McDonald, 2003; Gross *et al.*, 2003; Richardson, 2003; Fent *et al.*, 2006; Servos & Servos, 2006; Khetan & Collins, 2007).

Grupo	Exemplos de substâncias
Pesticidas	Atrazina, lindano, triclosan, DBCP (dibromocloropropano), PCP (pentaclorofenol), rifuralin
Esteróides naturais	Androgênios, estrogênios, fitoestrogênios
Fármacos	Fluoxetina, tamoxifan, fluvastatina, medetomidina, propranolol, hormônios sintéticos
Produtos químicos industriais	Alquifenóis, ftalatos, bisfenol-A, estireno, retardantes de chama bromados (PBDEs), surfactantes (incluindo perfluorocetosulfonatos – PFOS)

1. NIBB INTERNATIONAL CONFERENCE. 2001. *Recent Progress in Endocrine Disruptor Research*. Okazaki, Japan. 89p.

ALTERAÇÃO DO SISTEMA ENDÓCRINO

O sistema endócrino de quase todos os animais, sejam eles vertebrados ou invertebrados, é formado por glândulas que secretam hormônios. É um sistema de comunicação que age através de mensageiros circulantes regulando a atividade e o metabolismo, integrando o organismo como um todo.

Hormônios são substâncias de ação sistêmica que exercem efeitos específicos em todas as células ou em determinadas células de um órgão, desempenhando funções reguladora ou homeostática, integradora, morfogenética e permissiva (Frieden & Lipner, 1975). Os DE podem manifestar seus efeitos em cada um dos estágios da dinâmica hormonal (produção de hormônios, ligação aos receptores, ação hormonal, excreção e biotransformação) (Crain *et al.*, 2000), atuando nos sítios receptores e no conjunto de enzimas associado ao ciclo hormonal, interferindo nos mecanismos de retroalimentação e nas interconexões com os sistemas nervoso e imunológico (Jacobs, 2001).

Ainda que a compreensão dos mecanismos de ação dos DE seja incompleta e fragmentada, é reconhecida parte do *modus operandi* de alguns DE sob certos tipos de receptores nucleares. A associação entre hormônios e seus receptores constitui um complexo em que mudanças conformacionais levam à ativação das moléculas originadas (Das *et al.*, 2004). Esta ligação é o passo inicial de uma série de eventos em cascata que irão regular as respostas dos genes suscetíveis aos hormônios, culminando nas múltiplas respostas fisiológicas induzidas por esta relação de dependência (Laws *et al.*, 2006). Em condições normais, um hormônio natural se liga ao seu receptor e ativa os genes no núcleo para produzir a resposta

biológica apropriada (Colborn *et al.*, 2002). Em situações em que ocorram DE cuja forma e distribuição das cargas elétricas são apropriadas (Spiro & Stigliani, 2000), esta ligação pode ser bloqueada ou mimetizada, com a possibilidade de desencadear respostas adversas, provocando alteração da atividade celular.

Embora o sistema endócrino de organismos adultos seja passível de danos, segundo Thomas (1998) esse sistema é, em geral, resistente a mudanças impostas pela exposição de uma substância química. Entretanto, alterações durante períodos sensíveis ou críticos de desenvolvimento (como no desenvolvimento embrionário) podem gerar alterações importantes, as quais podem se manifestar em fases tardias do ciclo de vida ou mesmo serem translocadas às gerações posteriores.

Entre as muitas definições propostas para DE, a elaborada pela USEPA (1998) abrange de forma concisa este grupo de poluentes: “um agente exógeno que interfere com a síntese, secreção, transporte, recepção, ação ou eliminação dos hormônios naturais do corpo, os quais são responsáveis pela manutenção da homeostasia, reprodução, desenvolvimento e comportamento”. Como o sistema endócrino mantém a homeostase, todo agente estressante é, por definição, um interferente em potencial do sistema endócrino (Giesy, 2003). Porém, neste ponto é necessário diferenciar desregulador endócrino de modulador endócrino, a fim de reduzir e definir o grupo de poluentes, o qual mesmo assim se mantém bastante amplo. A modulação endócrina é caracterizada como interferência de menor amplitude ou consequência que não leva a um efeito drástico, sendo passível de recuperação. Já os efeitos dos desreguladores são mais severos, e muitas vezes a reversão não é sustentada (SETAC, 2000) (Figura 1).

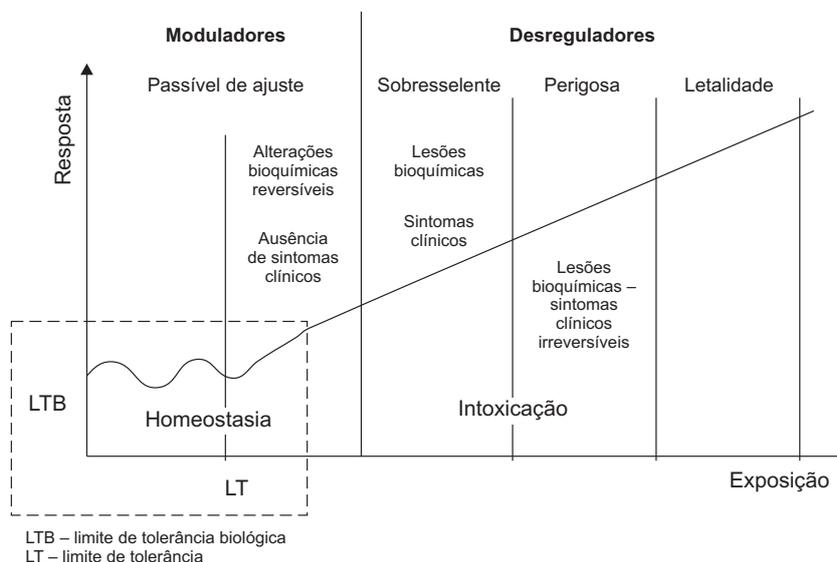


Figura 1 – Distinção entre moduladores e desreguladores endócrinos (modificado de Fernicola, 1987).

CONTAMINAÇÃO DE AMBIENTES AQUÁTICOS POR DE

A contaminação dos ambientes hídricos por agentes com atividade desreguladora se deve, principalmente, ao lançamento de efluentes domésticos e industriais. Estudos relatam que, mesmo após o processamento do material de entrada em estações de tratamento de esgotos (ETE), esses compostos não são completamente eliminados dos efluentes, indicando que as tecnologias mais empregadas não suprem as necessidades de tratamento destes até então contaminantes “ignorados” (Erickson, 2002).

Assim que um efluente é lançado, a dispersão e o transporte das várias substâncias que o contaminam são dependentes tanto das propriedades físicas e químicas do meio receptor quanto das próprias características das substâncias disponibilizadas (Servos *et al.*, 1996). Predizer o destino e a exposição da biota aquática aos contaminantes em razão da dinâmica do meio e da ampla diversidade de estruturas químicas existentes nos efluentes é ponto crítico em estudos ambientais. Além dos efeitos sobre os organismos e suas populações, podem surgir efeitos sobre todo o ecossistema atingido. Esses efeitos ocorrem devido às interações existentes entre os organismos e o seu meio e, dessa forma, sua real extensão sobre os organismos pode ser descrita como “ecossistema-dependente” (Connell & Miller, 1984).

De acordo com Herricks (2002), efeitos crônicos produzidos por baixas concentrações de substâncias poluentes são de difícil observação em função de as respostas serem, muitas vezes, indiretas. Portanto, atenção especial deve ser reservada aos estudos que tratam dos efeitos em baixas concentrações de exposição. Routledge e colaboradores (1998) relatam que certos DE causam efeitos deletérios às espécies aquáticas em concentrações menores que $0,001 \mu\text{g L}^{-1}$.

Manahan (2002) sustenta a hipótese de que a preocupação ecotoxicológica mais óbvia, considerando-se as substâncias que causam alteração no sistema endócrino, diz respeito à reprodução das espécies e ao desenvolvimento da prole gerada. Substâncias tóxicas que interferem com essas funções têm o potencial de reduzir severamente populações-chave nos ecossistemas e, com isso, alterar a natureza dos mesmos.

RISCOS À SAÚDE HUMANA

Deve-se ter em mente que diversas substâncias que participam intensamente de nosso cotidiano são consideradas poluentes emergentes. Entre elas destacam-se diversos fármacos, como antibióticos (trimetoprim, eritromicina, lincomicina e sulfametoxazol), analgésicos e antiinflamatórios (codeína, ibuprofem, acetaminofem, ácido acetilsalicílico, diclofenaco e fenoprofem), drogas psiquiátricas (diazepam), contrastes para exames radiológicos (iopromide, iopamidol e diatrizoato), além de diversos produtos de higiene pessoal como fragrâncias (Musks), protetores solar (benzofenona e metilbenzilideno

cânfora) e repelentes de insetos (N,N-dietiltoluamida) (Barceló, 2003).

Além do uso direto dessas substâncias no dia-a-dia, há ainda as rotas indiretas de contaminação através do ar, água e alimentos. Em relação à alimentação, deve-se considerar a presença de resíduos de pesticidas nas hortaliças e frutas, o uso de conservantes, hormônios e antibióticos nas carnes ou ainda a utilização de latas e embalagens que podem conter moléculas ativas que migram e se concentram nos alimentos (Pillière, 2002). Além disso, materiais utilizados na fabricação de móveis, eletrodomésticos e vestuário possuem substâncias químicas potencialmente perigosas, as quais vão sendo desagregadas ao longo do tempo e liberadas aos ambientes domésticos, de trabalho e recreação, constituindo rota importante de contaminação.

Pelo fato de diversas dessas substâncias agirem sobre o metabolismo hormonal e, por suas vez, de diversas condições patológicas (tais como o câncer de mama, testículo e próstata, além de disfunção reprodutiva) serem afetadas por influências hormonais, é plausível afirmar que a exposição aos poluentes emergentes, potencialmente DE, seja capaz de induzir efeitos adversos à saúde humana (Koifman & Paumgarten, 2002).

No segundo semestre de 2000, em duas importantes reuniões científicas ocorridas nos EUA (Kaiser, 2000) e Europa (Skakkebaek *et al.*, 2000), chegou-se ao consenso de que doses extremamente baixas de certos DE (na faixa de partes por bilhão – ppb) podem ser capazes de induzir efeitos em animais e, pelo princípio da precaução, o contato dessas substâncias com seres humanos deve ser evitado ao máximo. Como as pessoas são constantemente expostas a misturas de substâncias naturais e sintéticas, não pode ser descartada a ocorrência de interações sinérgicas entre esses compostos, tanto no ambiente como também dentro do organismo (Santé Canada, 1998).

Um dos pontos mais controversos relacionado aos DE é o suposto envolvimento na tendência mundial de diminuição da idade de entrada na fase de puberdade (Skakkebaek *et al.*, 2000). Outra questão diz respeito à redução da qualidade dos espermatozoides, que vem sendo computada ao longo dos últimos 50 anos, e às graves conseqüências que tal declínio teriam sobre a fertilidade de populações humanas (Multigner & Oliva, 2002).

Pesquisas recentes têm constatado o elevado o grau de periculosidade representado pelos DE. Shughrue & Merchantaler (2000), por exemplo, discutem novos receptores para estrógenos em regiões do cérebro (hipocampo e córtex) associadas ao aprendizado e à memória. Mori e colaboradores (2003) analisaram a exposição de fetos (tecido do cordão umbilical) a uma combinação múltipla de químicos DE e concluíram que ao menos 20 substâncias podem ser transferidas através da placenta para os fetos. Além disso, Borget e colaboradores (2003) relatam a existência de vários DE no leite materno.

Como poucas informações estão disponíveis e sabendo-se que alguns desreguladores endócrinos são capazes de produzir efeitos, mesmo em concentrações muito baixas, é

aconselhável alocar esforços para determinações destes alteragenes² em fontes potenciais de exposição humana, como em alimentos e nas águas de abastecimento urbano.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A questão dos poluentes emergentes vem mudando o eixo das pesquisas em poluição e toxicologia ambiental. Tal afirmação é reforçada pelo fato de a União Européia ter recentemente destinado milhares de euros para estudos sobre DE (Pickering & Sumpter, 2003). Brönmark & Hansson (2002), em seu trabalho sobre as ameaças aos ambientes aquáticos, traçam tendências (cenários) até o ano de 2025, colocando os poluentes emergentes com ação desreguladora endócrina, juntamente com as mudanças climáticas e a introdução de espécies exóticas e organismos geneticamente modificados, entre os tópicos que crescerão em importância.

A partir dos textos de Almeida (1983), Juberg (2000), IPCS (2002), Lathers (2002) e do Center for Bioenvironmental Research at Tulane and Xavier Universities (2004), é possível enumerar temas prioritários para estudo, ficando evidente a importância de aumentar o esforço da pesquisa sobre os DE, em especial os ditos *compostos emergentes*, principalmente no que tange à quantidade emitida para o ambiente, número de substâncias sintéticas que podem atuar como hormônios (considerando um universo de milhares que a cada ano é consideravelmente incrementado), capacidade de acumulação na forma original ou sob a forma de produto de degradação ou de metabolismo, determinação da concentração de DE em vários compartimentos ambientais e execução de comparações com concentrações de efeito, efeito da exposição a múltiplos DE, avaliação do grau de exposição de grupos populacionais, especialmente certos grupos críticos, definição das respostas dos DE (*endpoints*) dentro dos sistemas biológicos em seus vários níveis de organização (moléculas-ecossistemas), pesquisa sobre os efeitos sequenciais dos DE (se a exposição a uma substância no presente tornaria o organismo mais suscetível a exposições futuras de outras substâncias), aperfeiçoamento e desenvolvimento das técnicas analíticas, criação de um banco de dados de âmbito global, desenvolvimento (aplicação) de novas tecnologias em estações de tratamento de esgoto e água, instituição de programas de monitorização em pontos críticos e, finalmente, revisão dos modos de produção e consumo da sociedade moderna.

Agradecimentos — À FAPESP pela concessão de bolsas de pesquisa (Processos 03/05772-0 e 07/50039-0) e ao biólogo Domingos Sávio Barbosa pelo trabalho computacional nas ilustrações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, W. F., 1983, Pesticidas e câncer. In: A. F. Montoro & D. P. Nogueira (coords.). *Meio ambiente e câncer*. T.A. Queiroz/CNPq, pp. 101-114.
- BARCELÓ, D., 2003, Emerging pollutants in water analysis. *Trends Anal. Chem.*, 22: XIV-XVI.
- BORGET, C. J., La KIND, J. S. & WITORSCH, R. J., 2003, A critical review of methods for comparing estrogenic activity of endogenous and exogenous chemicals in human milk and infant formula. *Environ. Health Perspect.*, 111: 1020-1036.
- BRÖNMARK, C. & HANSSON, L. A., 2002, Environmental issues in lakes and ponds: current state and perspectives. *Environ. Conserv.*, 29: 290-306.
- BRUCHET, A., PROMPSY, C., FILLIPPI, G. & SOUALI, A., 2002, A broad spectrum analytical scheme for the screening of endocrine disruptors (EDs), pharmaceuticals and personal care products in wastewaters and natural waters. *Water Sci. Technol.*, 46: 97-104.
- CENTER FOR BIOENVIRONMENTAL RESEARCH AT TULANE AND XAVIER UNIVERSITIES, 2004, Disponível em: <http://e.hormone.tulane.edu/learning/effects.html/>. Acesso: em 2 ago. 2004.
- COLBORN, T., DUMANOSKI, D. & MYERS J. P., 2002, *O futuro roubado*. L&PM., 354p.
- CONNELL, D. W. & MILLER, G. J., 1984, *Chemistry and ecotoxicology of pollution*. John Wiley & Sons, 444p.
- CRAIN, D. A., ROONEY, A. A., ORLANDO, E. F. & GUILLETTE, L. Jr., 2000, Endocrine disrupting contaminants and hormone dynamics: lessons from wildlife, pp. 1-21. In: L. J. Guillette & D. A. Crain (eds.), *Environmental endocrine disruptors: an evolutionary perspective*. Taylor & Francis, New York, NY, 355 p.
- GUILLETTE Jr. & CRAIN, D. A. (eds.) *Environmental endocrine disruptors, an evolutionary perspective*. Taylor & Francis, New York, NY, 355p.
- DAS, D., PETERSON, R. C. & SCOVELL, W. M., 2004, High mobility group B proteins facilitate strong estrogen receptor binding to classical and half-site estrogen response elements and relax binding selectivity. *Mol. Endocrinol.*, 18: 2616-2632.
- DE FREITAS, A. J., 2000, Gestão de recursos hídricos, pp. 1-120. In: D. D. da Silva & F. F. Pruski (eds.), *Gestão de recursos hídricos: aspectos legais, econômicos, administrativos e sociais*. MMA/UFV/ABRH, Brasil, 659p.
- ERICKSON, B. E., 2002, Analyzing the ignored environmental contaminants. *Environ. Sci. Technol.*, 36: 140A-145A.
- FENT, K., WESTON, A. A., CAMINADA, D., 2006, Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicol.*, 76: 122-159.
- FERNÍCOLA, N. A. G. G., 1987, Toxicologia ambiental y el laboratorio de analisis toxicológicas. *Toxicologia*, 2: 73-88.
- FRIEDEN, E. & LIPNER H., 1975, *Endocrinologia bioquímica dos vertebrados*. Edgar Blucher São Paulo, 131p.
- GIESY, J. P., 2003, Endocrine disruptor mechanisms: beyond receptor binding. in: *integrating novel approaches to pollution research in terrestrial and marine environments*. Aberdeen, Scotland. September 8-10 (Keynote Address). Disponível em: <http://www.msu.edu/~giesy/Giesy-keynote-DES.pdf/>. Acesso em: 28 fev. 2007.

2. ALTERAGENE – todo fator ou substância que promova uma alteração do meio ambiente em que for inserido.

- GROSS, T. S., ARNOLD, B. S., SEPÚLVEDA, M. S. & Mc DONALD, K., 2003, Endocrine disrupting chemicals and endocrine active agents. In: D. J. Hoofman, B. A. Rattner, G. A. Burton Jr. & J. Cairns Jr. (eds.), *Handbook of ecotoxicology*. 2nd ed., Lewis Publish, CRC Press, Boca Raton, Florida, FL (electronic version).
- BURTON Jr. & J. CAIRNS Jr. (eds.), *Handbook of ecotoxicology*. 2nd ed., Lewis Publish, CRC Press, Boca Raton, Florida (electronic version).
- HERRICKS, E. E., 2002, Princípios gerais de toxicologia, pp. 9-29. In: S. Matsui (ed.) *Diretrizes para o gerenciamento de lagos: gerenciamento de substâncias tóxicas em lagos e reservatórios*. ILEC/IE, São Carlos, São Paulo, 199p.
- IPCS – INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, 2002, *Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors*. Geneva, 180p.
- JACOBS, M., 2001, *Unsafe sex: how endocrine disruptors work*. Pesticide Action Network (PAN). Briefing 4., 14p. Disponível em: <http://www.pan-uk.org/Publications/Briefing/safesex.pdf/>. Acesso em: 28 jan. 2007.
- JUBERG, D. R., 2000, An evaluation of endocrine modulators: implications for human health. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 45: 93-105.
- KAISER J., 2000, Panel cautiously confirms low-dose effects. *Nature*, 290: 695-697.
- KHETAN, S. K. & COLLINS, T. J. 2007, Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to green chemistry. *Chem. Rev.*, in press, (published on web).
- KOIFMAN, S. & PAUMGARTTEN, F. J. R., 2002, O impacto dos desreguladores endócrinos ambientais sobre a saúde pública. *Cad. Saúde Pública*, 18: 354-355.
- LATHERS, C. M., 2002, Endocrine disruptors: a new scientific role for clinical pharmacologists? Impact on human health, wildlife, and the environment. *J. Clin. Pharmacol.*, 42: 7-23.
- LAWS, S. C., YAVANHXAY, S., COOPER, R. L. & ELDRIDGE, J. C., 2006, Nature of the binding interaction for 50 structurally diverse chemicals with rat estrogen receptors. *Toxicol. Sciences*, 94: 46-56.
- MANAHAN, S. E., 2002, *Toxicological chemistry and biochemistry*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 425p.
- McGOVERN, P. & Mc DONALD, H. S., 2003, Endocrine disruptors. The next generation of regulatory concern? *Water Environ. Technol.*, 15: 35-39.
- MORI, C., KOMIYAMA, M., ADACHI, T., SAKURAI, K., NISHIMURA, D., TAKASHIMA, K. & TODAKA, E., 2003, Application of toxicogenomic analysis to risk assessment of delayed long-term effects of multiple chemicals, including endocrine disruptors in human fetuses. *Environ. Health Perspect.*, 111: 803-809.
- MULTIGNER, L. & OLIVA, A., 2002, Secular variations in sperm quality: fact or science fiction? *Cad. Saúde Pública*, 18: 403-412.
- NAS – NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, 1999, *Hormonally active agents in the environment*. Washington, 430p.
- PICKERING, A. D. & SUMPTER, J. P., 2003, Comprehending endocrine disruptors in aquatic environments. *Environ. Sci. Technol.*, 37: 331A-336A.
- PILLIÈRE F., 2002, Perturbateurs endocriniens et effets toxiques. *Documents pour le Médecin du Travail*, 92: 377-381.
- RICHARDSON, S. D., 2004, Environmental mass spectrometry: emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.*, 76: 3337-3364.
- ROUTLEDGE, E. J., BRIGHTY, G. C., WALDOCK, M. & SUMPER, J. P., 1998, Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. *in vivo* responses in trout and roach. *Environ. Sci. Technol.*, 32: 1559-1565.
- SADIK, O. A. & WITT, D. M., 1999, Monitoring endocrine disrupting chemicals. *Environ. Sci. Technol.*, 33: 368A-374A.
- SANTÉ CANADA, 1998, *Manuel sur la Santé et L'environnement à L'intention des Professionnels de la Santé: Guide des Ressources*. 191p. Disponível em: <http://www.hc-sc.gc.ca/>. Acesso em: 3 abr. 2001.
- SAWYER, C. N., Mc CARTY, P. L. & PARKIN, G. F., 2003, *Chemistry for environmental engineering and science*. 5th ed., McGraw-Hill Educations (Asia) and Tsinghua University Press, China, 752p.
- SERRANO, N. O., CABRERA, M. F. F., ENCINAS, R. P. & SERRANO, F. O., 2002, Endocrine disrupting chemicals. Harmful substances and how to test them. *Cad. Saúde Pública*, 18: 489-494.
- SERVOS, M. R. & SERVOS M. C., 2006, Emerging chemicals derived from municipal wastewater. In: W. A. Stubblefield, M. R. Servos, R. M. Gersberg, C. Riley, D. Simpson, D. Smith & P. Wells (eds.), *Scientific and technical review: Capital Regional District core area liquid waste management plan*. Capital Regional District, Victoria, B.C. (Appendix to Expert Panel Review), Waterloo, Ontário, Canada, 40p.
- SERVOS, M. R., MUNKITTRICK, K. R., CAREY, J. H. & VAN DER KRAAK, G. J. (eds.), 1996, *Environmental fate and effects of pulp and paper mill effluents*. St. Lucie Press., Delray Beach, FL, 703p.
- SETAC – SOCIETY OF ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY, 2000, *Endocrine disruptors and modulators*. Technical Issue Paper (TIP), Pensacola, 5p.
- SHUGHRUE, P. J. & MERCHENTHALER, I., 2000, Estrogen is more than just a “sex hormone”: novel sites for estrogen action in the hippocampus and cerebral cortex. *Front. Neuroendocrinol.*, 21: 95-101.
- SKAKKEBAEK, N. E., LEFFERS, H., MEYETS, E. R., CARLSEN, E. & GRIGOR, K. M., 2000, Should we watch what we eat and drink? *Trends Endocrinol. Metab.*, 11: 291-293.
- SPIRO, T. G. & STIGLIANI, W. N., 2000, *Chemistry of the environment*. Prentice Hall, Tsinghua University Press, China, 356p.
- THOMAS, J. A., 1998, Drugs and chemicals that affect the endocrine system. *Int. J. Toxicol.*, 17: 129-138.
- TYLER, C. R. & ROUTLEDGE, E. J., 1998, Oestrogenic effects in fish in english rivers with evidence of their causation. *Pure & Appl. Chem.*, 70: 1795-1804.
- USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1998, *Research plan for endocrine disruptors*. 47p.

4.3 3º Artigo

Título: FÁRMACOS, ETES E CORPOS HÍDRICOS

Periódico: Revista Ambiente e Água

Fármacos, ETes e corpos hídricos

**Ricardo Wagner Reis Filho¹; Juliana Cristina Barreiro²; Eny Maria Vieira³
Quezia Bezerra Cass⁴**

¹Doutorando em Ciências da Engenharia Ambiental pela EESC/CRHEA – USP, Av. Trabalhador São-carlense, 400 – Centro, Caixa Postal 359, CEP 13566-590, São Carlos - SP – Brasil.

E-mail: reisfo@yahoo.com.br.

²Pós-doutorado – Grupo de Síntese Orgânica e CLAE - Departamento de Química da UFSCar, Rodovia Washington Luiz, Km 235 - Caixa Postal 676, CEP 13565-905, São Carlos - SP – Brasil.

E-mail: juliana.barreiro@gmail.com.

³Professora Doutora do DQFM/USP-IQSC, Av. Trabalhador São-carlense, 400 – Centro, Caixa Postal 359, CEP 13566-590 São Carlos - SP – Brasil.

E-mail: eny@iqsc.usp.br.

⁴Professora Adjunta do Departamento de Química da UFSCar, Rodovia Washington Luiz, Km 235 - Caixa Postal 676, CEP 13565-905, São Carlos - SP – Brasil

E-mail: quezia@pq.cnpq.br.

RESUMO

Na última década, especial atenção tem sido dada à presença de compostos farmacêuticos no ambiente aquático; uma vez que o aporte contínuo e a persistência de várias dessas substâncias podem trazer danos irreversíveis à biota. Sendo assim, o desenvolvimento e aplicação de novas tecnologias de tratamento que permitam a remoção ou diminuição desses contaminantes tem sido objeto de interesse na área de saneamento ambiental. Entretanto, a não existência de programas específicos de monitoramento nas ETes, impossibilita a avaliação do comportamento dos fármacos nas plantas instaladas. O presente trabalho ilustra os principais fatores envolvidos no aporte desses contaminantes e apresenta um alerta do caminho a ser percorrido, na implementação de sistemas de tratamento adequados para minimizar a deterioração dos ecossistemas aquáticos.

Palavras-chave: ambiente aquático; contaminação; tratamento de água.

Pharmaceutical drugs, WWTP and hydric bodies

ABSTRACT

In the last decade, special attention has been given to the presence of pharmaceutical compounds in the aquatic environment; once that continuous supply and persistence of these substances can be severally prejudicial to the biota. Thus, the development and application of new technologies that allows the removal or a decrease in the content of these contaminants has been the focus of the environment sanitation area. However, the absence of specific monitoring programs at the waste water treatment plant (WWTP) does not allow the impact evaluation of pharmaceutical drugs in the installed plants. This work discusses the factors involved in the inflow of these contaminants in the environment, and call attention for the implementation of adequate treatment systems to minimize the deterioration of the aquatic ecosystems.

Keywords: aquatic environment; contamination; water treatment.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da indústria farmacêutica, que hoje disponibiliza para o mercado milhões de substâncias com propósito terapêutico, acarretou colateralmente um grave problema ambiental, o qual vem crescendo em atenção e preocupação nas agências controladoras do ambiente de várias nações (Garric et al., 2003). O aporte de substâncias farmacologicamente ativas, denominadas “emergentes”, no ambiente advém do uso intenso e extensivo no tratamento de doenças em seres humanos e animais; sendo excretadas na forma não metabolizada ou como um metabólito ativo e introduzidas, principalmente, a partir do lançamento via efluentes municipais e industriais nos corpos hídricos receptores das águas servidas (Chapman, 2006; Petrović et al., 2005; Calamari et al., 2003) (Figura 1).

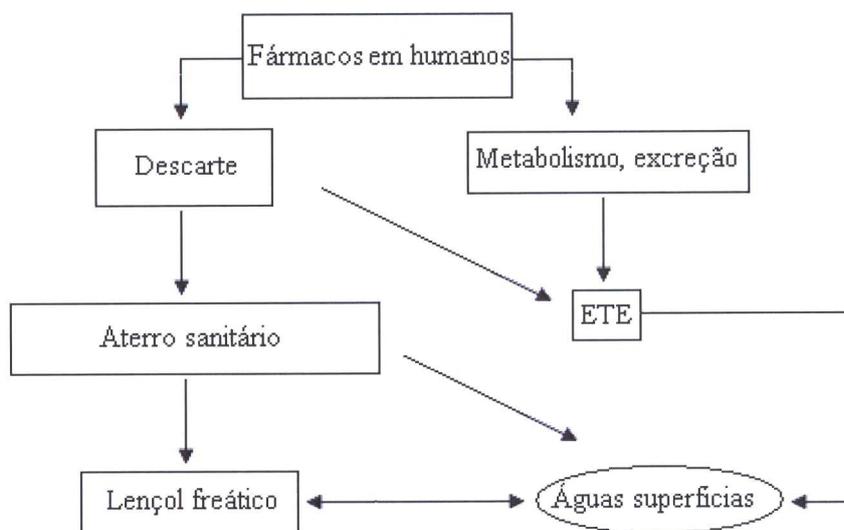


Figura 1. Rotas simplificadas da entrada de fármacos nos ambientes aquáticos.

A quantidade de fármacos ativos (PhACs) e produtos de uso pessoal (PPCPs), fragrâncias, xampus, cosméticos, etc., que adentram ao ambiente em cada ano, é estimada como sendo similar ao total de pesticidas utilizados durante o mesmo período (Daughton; Ternes, 1999). Sendo assim, a contínua entrada pode levar a um aumento na concentração e promover efeitos adversos os quais podem não ser facilmente percebidos nos organismos aquáticos e terrestres (Petrović et al., 2005). Na Tabela 1, encontram-se apresentadas as principais classes de fármacos com potencial de dano para organismos aquáticos (Boxall, 2004; Cunningham et al., 2006).

Em termos de periculosidade, esses grupos de compostos possuem uma série de agravantes: 1) Muitos são persistentes, assim como seus produtos de degradação; mesmo aqueles que possuem meia-vida curta são passíveis de causar exposições crônicas devido a sua introdução contínua no ambiente; 2) Os fármacos são desenvolvidos para desencadear efeitos fisiológicos, e, conseqüentemente, a biota se torna mais suscetível a impactos desses compostos; 3) Embora a concentração de alguns fármacos encontradas no ambiente seja baixa, a combinação deles pode ter efeitos pronunciados devido ao mecanismo de ação sinérgica.

Tabela 1. Principais classes de fármacos com potencial dano para os organismos aquáticos.

Fármacos	Uso Terapêutico
Amoxicilina, tetraciclina, azitromicina, ciprofloxacina, eritromicina	Antibiótico
Diclofenaco, ibuprofeno	Antiinflamatório
17 α -etinilestradiol, 17 β -estradiol, dietilbestrol, levonorgestrel, testosterona, tiroxina	Hormônios
Reserpina	Anti-hipertensivo
Omeprazol, ranitidina	Antiulceroso
Paracetamol, dipirona sódica, codeína, ácido acetilsalicílico, tramadol	Analgésico
Captopril, propranolol, diltiazem, verapamil, lisinopril	Cardiovascular
Diazepam, fluoxetina, citalopram	Antidepressivo

Dentre a variedade de fármacos com estruturas, funções e atividades diferentes, existem aqueles que fazem parte do amplo grupo dos compostos disruptores endócrinos (EDCs). Os EDCs são agentes exógenos que interferem no sistema endócrino, o qual sumariamente pode ser descrito como o mecanismo responsável pela manutenção de funções biológicas normais dos organismos por meio da síntese e secreção de hormônios (Lintelmann et al., 2003). Sanderson et al. (2004), estudando a toxicidade de fármacos, demonstraram que os hormônios sexuais encontram-se entre os mais tóxicos para uma série de organismos aquáticos, tais como: cladóceros, peixes e algas. Esses hormônios sintéticos são compostos que agem como sinais e desencadeiam suas funções mesmo em concentrações extremamente baixas (ordem de nanogramas), portanto, representam um perigo potencial para a biota aquática residente nos locais de despejo de efluentes ou esgotos *in natura*.

1.1. Adequação das ETEs em uso no Brasil na remoção de PhACs

Em recente levantamento, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2004) apontou que apenas 20,2% dos municípios brasileiros possuem condições de esgotamento sanitário adequado com coleta e tratamento. Esse quadro, por si só, é extremamente preocupante em razão dos problemas de saneamento ambiental relacionados com as doenças de veiculação hídrica. Fagundes (2003) estimou que, para cada dólar gasto em saneamento, seriam economizados cem dólares em saúde pública. Sendo que de acordo com especialistas, o país ainda necessita de investimentos da ordem de R\$ 142,4 bilhões para sanar o déficit em coleta e tratamento (Sampaio, 2005).

Estudos de remoção de fármacos em ETE's brasileiras são raros e esparsos. Ternes et al. (1999) e Stumpf et al. (1999) foram os primeiros a reportarem a presença de hormônios, antiinflamatórios e antilipêmicos em esgoto, efluentes e em águas de rios no Estado do Rio de Janeiro.

Em relação às ETE's existentes, Oliveira e Von Sperling (2005a; 2005b) compilaram e avaliaram a eficiência de vários tipos de tecnologias, em razão da remoção de constituintes "clássicos" de águas residuárias. Neste trabalho, estão citadas como as mais comumente empregadas no país: i) Fossa séptica seguida de filtro anaeróbio; ii) Lagoas facultativas, iii) Lagoas anaeróbicas seguidas por facultativas; iv) Lodos ativados; v) Reatores UASB e vi) Reatores UASB seguidos por pós-tratamento.

Considerando os sistemas citados anteriormente, a literatura internacional é vasta e diversificada em relatar os desempenhos dessas tecnologias na redução da concentração de

fármacos. Jones et al. (2005) compararam o uso do sistema de lagoas (1) e tratamento com lodo ativado (2) durante a remoção do fármaco diclofenaco em lagos da Suíça, e observaram que a remoção foi 76% maior no sistema 1. Sendo, o uso de sistemas de lagoas de sedimentação importante durante a degradação de compostos, principalmente aos sensíveis à luz (Jones et al., 2005). Porém em razão do número expressivo de substâncias que adentram as unidades de tratamento, as taxas de remoção são bastante distintas, sendo desde nula a até próximas de 100% (Svenson et al., 2003; Lee et al., 2003; Carballa, 2004).

Sistemas compostos por lagoa de aeração, sedimentação e lodo estão entre os mais utilizados durante o tratamento de efluentes nas ETEs brasileiras, no entanto a não existência de um programa de monitoramento específico nas ETEs, impossibilita o cálculo das quantidades de fármacos que adentram, e que são removidos nas estações. Principalmente porque o clima local e o regime de operação das unidades são fundamentais para se determinar o comportamento dessas substâncias durante a passagem pelas várias etapas de tratamento.

Dentro do complexo panorama sanitário nacional, parece claro que as tecnologias indicadas como próximas às ideais para remoção desses poluentes são inviáveis de serem adotadas pelos órgãos responsáveis pelo saneamento, devido ao elevado custo de implantação. As tecnologias recomendadas (Drewes et al., 2002; Wintgens et al., 2002; Andersen et al., 2003) são: i) Ozonização, ii) Radiação UV, iii) Adsorção por carvão ativado, iv) Filtração em membranas (nanofiltração), v) Tratamento terciário seguido de injeção em aquífero (soil-aquifer treatment - SAT), vi) Osmose reversa. Alguns pesquisadores ainda recomendam a separação das águas de toailete das demais para serem especificamente tratadas e disponibilizadas (Larsen et al., 2001; Escher et al., 2006).

Porém, depois que estudos regulares venham a ser implementados, algumas modificações menores talvez possam ser empregadas nas ETEs operantes, como tentativas de se alcançar uma melhor eficiência na remoção de fármacos. O aumento do tempo de retenção hidráulica e conseqüente diminuição da taxa de produção de lodo (maior envelhecimento do lodo) parecem trazer resultados positivos no decréscimo de certos compostos, devido ao incremento da atividade microbiana (Metcalf et al., 2003). Outra medida a se cogitar é a construção de sistemas alagados artificiais agregados às unidades de tratamento, as quais vêm sendo já há algum tempo avaliadas como uma alternativa viável (relação custo-benefício) para a redução de cargas poluidoras (Greenway; Simpsons, 1996). Os sistemas alagados funcionam como um filtro que retém e processam poluentes orgânicos, permitindo sua decomposição em razão da alta diversidade biológica existente. Embora sejam necessários mais estudos, Matamoros e Bayona (2006) comprovaram a viabilidade desses sistemas na remoção de fármacos em efluentes.

De qualquer forma, além da busca de soluções que propiciem a redução/eliminação da carga de produtos farmacêuticos, é essencial a utilização de ensaios de toxicidade específicos na busca por atividade farmacodinâmica nas águas de lançamento das ETEs.

1.2. Ecotoxicologia de PhACs

Resíduos de fármacos em águas de despejo já são comumente reportados em vários estudos (Drewes et al., 2005; Zhou et al., 2006). A presença desses múltiplos compostos implica também múltiplas vias de ação, podendo interferir significativamente na fisiologia, no metabolismo e no comportamento das espécies; além de causar efeitos secundários, os quais podem alterar a defesa imunológica de organismos tornando-os mais susceptíveis à presença de parasitas e doenças. É o caso, por exemplo, dos compostos pertencentes à classe dos antibióticos, os quais são amplamente utilizados, e sua emissão no ambiente pode levar a um

aumento na ocorrência de bactérias resistentes e conseqüentemente mais nocivas (Petrović et al., 2005).

Os métodos tradicionais empregados na avaliação da toxicidade em organismos aquáticos por substâncias químicas parecem não ser suficientemente adequados. Sendo assim, cabe ressaltar a importância de estudos que propiciem em longo prazo verificarem a influência de concentrações consideradas ambientalmente relevantes a esses organismos. Nesse sentido, instituições e órgãos ambientais de diversos países vêm investindo em pesquisas na procura de indicadores adequados aos efeitos desencadeados por fármacos (Boxall, 2004; Jones et al., 2004; Chapman, 2006; Fent et al., 2006).

Os peixes por sua inerente importância ecológica e econômica estão entre os organismos mais investigados. A fisiologia de seu sistema reprodutivo é regulada por hormônios similares aos dos mamíferos (Mills; Chichester, 2005), portanto, é de se esperar que efeitos ocorram quando do descarte de substâncias estrogênicas no meio aquático. Compostos esteróides usados como contraceptivos orais e de reposição, são potentes e podem causar efeitos biológicos irreversíveis, mesmo quando presentes em baixas concentrações, sendo responsáveis pelas elevadas taxas de demasculinização e feminização em peixes em diversos ambientes aquáticos ao redor do mundo (Edwards et al., 2006).

Nesse contexto, a proteína vitelogenina (VTG) que serve de reserva alimentar para o embrião em desenvolvimento dos vertebrados vivíparos parece ser um biomarcador de exposição apropriado na avaliação dos efeitos de hormônios ou outra classe de fármacos que mimetizam a ação destes. Sua presença em peixes machos só é possível mediante indução externa, já que a sua produção é desencadeada pela atividade de hormônios femininos (Lintelmann et al., 2003).

Assim sendo, as companhias de saneamento devem se adequar e incluir em sua rotina, variados testes ecotoxicológicos com a finalidade de monitorar os possíveis efeitos deletérios sobre a biota aquática. Conforme é frisado na nova resolução CONAMA 357/2005, em seu capítulo IV inciso 1º: “O efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de toxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente” (Brasil, 2005). Sem essa informação é inaceitável que as concentrações de substâncias potencialmente contaminantes presentes nas descargas tenham outro valor além de zero.

2. CONCLUSÃO

O controle da presença de resíduos de fármacos deverá ser mais uma variável a ser explorada durante o processo de gestão das estações de tratamento de efluentes. Sua monitoração na carga influente e efluente das estações é de importância crucial na estimativa de impactos nos corpos hídricos receptores de despejos. Embora a implementação de uma rotina de análise seja impraticável devido à enorme variedade de substâncias, esforços devem ser efetivados ao menos para as classes comprovadamente mais tóxica dos produtos de degradação e metabólitos gerados. Ênfase deve ser dada para ensaios ecotoxicológicos de misturas complexas (efluentes), visando à observação de efeitos comprovadamente desencadeados por fármacos.

Outro ponto fundamental na abordagem dessa problemática é em relação ao direcionamento de verbas públicas e privadas para pesquisas em engenharia hidráulica, ambiental, química e saneamento com o objetivo de incentivar e promover pesquisas aplicadas em tecnologias de detecção, degradação e remoção desses compostos ubiquamente utilizados.

3. AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, processo n.º 03705772-0, ao CNPq pelas de bolsas Pós-Doutorado (PDJ) e de Produtividade em Pesquisa (PQ) concedidas à Juliana Cristina Barreiro e Quezia Bezerra Cass, respectivamente.

4. REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, H.; SIEGRIST, H.; HALLING-SØRENSEN, B.; TERNES, T. A. Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 18, p. 4021-4026, 2003.
- BOXALL, A. B. A. The environmental side effects of medication. **EMBO reports**, v. 5, n. 2, p. 1110-1116, 2004.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA 357**. 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama>>. Acesso em: Acesso em 24 julho 2007.
- CALAMARI, D.; ZUCCATO, E.; CASTIGLIONI, S.; BAGNATI, R.; FANELLI, R. Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in northern Italy. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 7, p. 1241-1248, 2003.
- CARBALLA, M. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. **Water Research**, v. 38, n. 12, p. 2918-2926, 2004.
- CHAPMAN, P.M. Emergin substances – Emerging problems? **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 6, p. 1445-1447, 2006.
- CUNNINGHAM, V. L.; BUZBY M.; HUTCHINSON, T.; MASTROCCO, F.; PARKE, N.; RODEN, N. Effects of human pharmaceuticals on aquatic life: next steps. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 11, p. 3456-3462, 2006.
- DAUGHTON, C. G.; TERNES, T. A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? **Environmental Health Perspectives**, v. 107, n. S6, p. 907-938, 1999.
- DREWES, J. E.; HEBERER, T.; REDDERSEN, K. Fate of pharmaceuticals during indirect potable reuse. **Water Science and Technology**, v. 46, n. 3, p. 73-80, 2002.
- DREWES, J. E.; HEMMIN, J.; LADENBURGER, S. J.; SCHAUER, J.; SONZOGNI, W. An assessment of endocrine disrupting activity changes during wastewater treatment through the use of bioassays and chemical measurements. **Water Environment Research**, v.77, n.1, p. 12-23, 2005.
- EDWARDS, T.M.; MOORE, B.C.; GUILLETTE Jr, L.J. Reproductive dysgenesis in wildlife: a comparative view. **International Journal of Andrology**, v.29, n.1, p. 109-121, 2006.
- ESCHER, B. I.; PRONK, W.; SUTER, M. J. F.; MAURER, M. Monitoring the removal efficiency of pharmaceuticals and hormones in different treatment processes of source-separated urine with bioassays. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 16, p. 5095-5101, 2006.

- FAGUNDES, M. V. M. Moeda forte: cada dólar aplicado em esgoto pode valer 100 dólares em saúde. **Revista Bio**, v. 26, p. 20-21, 2003.
- FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 76, n. 2, p. 122-159, 2006.
- GARRIC, J.; TILGHMAN, A.; COGOLUÈGNES, A. In: EUROPEAN CONFERENCE ON HUMAN & VETERINARY PHARMACEUTICALS IN THE ENVIRONMENT (ENVIRPHARMA), 2003, Lyon. **Final Report: Summary of the Scientific**. Lyon: [S.n.], 2003.
- GREENNWAY, M.; SIMPSON, J. S. Artificial wetlands for wastewater treatment, water reuse and wildlife in Queensland, Australia. **Water Science and Technology**, v. 33, n. 10-11, p. 221-229, 1996.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- IBGE. **Atlas do saneamento**. Rio de Janeiro: IBGE, 2004. p. 151.
- JONES, O. A. H.; VOULVOULIS, N.; LESTER, J. N. Potential ecological and human health risks associated with the presence of pharmaceutically active compounds in the aquatic environment. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 34, n. 4, p. 335-350, 2004.
- _____. Human pharmaceuticals in wastewater treatment processes. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 35, n. 4, p. 401-427, 2005.
- LARSEN, T. A.; PETERS, I.; ALDER, A.; EGGEN, R.; MAURER, M.; MUNCKE, J. Re-engineering toilet for sustainable waste water management. **Environmental Science & Technology**, v. 35, n. 9, p. 192A-197A, 2001.
- LEE, H. B.; SARAFIN, K.; PEART, T. E.; SVOBODA, M. L. Acidic pharmaceuticals in sewage - methodology, stability test, occurrence, and removal from Ontario samples. **Water Quality Research Journal of Canada**, v. 38, n. 4, p. 667-682, 2003.
- LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZEL, A. Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, n. 5, p. 631-681, 2003.
- MATAMOROS, V.; BAYONA, J. M. Elimination of pharmaceuticals and personal care products in subsurface flow constructed wetlands. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 18, p. 5811-5816, 2006.
- METCALFE, C. D.; KOENIG, B. G.; TERNES, T. A.; HIRSCH, R. Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of canadian sewage treatment plants. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 12, p. 2872-2880, 2003.
- MILLS, L. J.; CHICHESTER, C. Review of evidence: are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? **Science of the Total Environment**, v. 343, n. 1/3, p. 1-34, 2005.
- OLIVEIRA, S. M. A. C.; VON SPERLING, M. Avaliação de 166 ETEs em operação no país, compreendendo diversas tecnologias. Parte 1: análise de desempenho. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, n. 4, p. 347-357, 2005a.
- _____. Parte 2: influência de fatores de projeto e operação. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, n. 4, p. 358-368, 2005b.

- PETROVIĆ, M.; HERNANDO, M. D.; DIAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Liquid chromatography – tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, n. 1/2, p. 1-14, 2005.
- SAMPAIO, A. R. Década da Água? **Revista Bio**, v. 34, p. 26-35, 2005.
- SANDERSON, H.; BRAIN, R. A.; JOHNSON, D. J.; WILSON, C. J.; SOLOMON, K. R. Toxicity classification and evaluation of four pharmaceuticals classes: antibiotics, antineoplastics, cardiovascular, and sex hormones. **Toxicology**, v. 203, n. 1/3, p. 27-40, 2004.
- SVENSON, A.; ALLARD, A. S.; EK, M. Removal of estrogenicity in swedish municipal sewage treatment plants. **Water Research**, v. 37, n. 18, p. 4433-4443, 2003.
- STUMPF, M.; TERNES, T. A.; WILKEN, R. D.; RODRIGUES, S. V.; BAUMANN W. Polar drugs residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 225, n. 1-2, p. 135-141, 1999.
- TERNES, T.A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R. D.; SERVOS, M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 225, n. 1/2, p. 81-90, 1999.
- WINTGENS, T.; GALLENKEMPER, M.; MELIN, T. Endocrine disrupter removal from wastewater using membrane bioreactor and nanofiltration technology. **Desalination**, v. 146, n. 1/3, p. 387-391, 2002.
- ZHOU, P.; SU, C.; LI, B.; QIAN, Y. Treatment of high-strength pharmaceutical wastewater and Removal of Antibiotics in Anaerobic and Aerobic Biological Treatment Processes. **Journal of Environmental Engineering**, v. 132, n. 1, p. 129-136, 2006.

CAPÍTULO 2: ANÁLISE QUÍMICA

2.1 – INTRODUÇÃO

O progresso recente das técnicas analíticas trouxe uma nova realidade para os estudos ambientais. Centenas de substâncias que até então se imaginava estarem presentes contaminando ou poluindo o ambiente, puderam ser confirmadas em inúmeras pesquisas (RICHARDSON & TERNES, 2005 e SERVOS & SERVOS, 2006). Este novo quadro levou a concepção de um termo, hoje de uso corrente na literatura científica especializada: Poluentes Emergentes. Segundo LUBOVICH, 2005 a USGS (United States Geological Survey) define poluentes emergentes como “qualquer microorganismo ou químico sintético ou natural o qual não é comumente monitorado no meio, mas têm o potencial de adentrar ao ambiente e causar efeitos adversos para a saúde humana e/ou dos ecossistemas”. Porém de acordo com FIELD et. al., 2006 a expressão poluentes emergentes é de difícil definibilidade, porque o conceito de emergente é matéria de perspectiva assim como de momento. Existem, porém duas categorias maiores para poluentes emergentes: 1) Substâncias conhecidas da indústria e comércio, as quais anteriormente não eram categorizadas como poluentes e 2) Novas substâncias introduzidas no ambiente, tais como fármacos, cosméticos, pesticidas, etc.

Fato, é que esta nova perspectiva de avaliação ambiental onde determinações de ordem ínfimas ($\mu\text{g.L}^{-1}$ ou ng.L^{-1}) podem ser executadas, acarretou uma mudança de direcionamento em que o “nada” passa a significar “alguma coisa”. Essa é a interpretação exata dada por SILVA et al., 2002 e RAJAPAKSE et al., 2002 em que misturas de elementos em baixíssimas concentrações são passíveis de desencadear efeitos pronunciados sobre a biota, particularmente desregulações endócrinas.

Neste contexto, não somente novos ambientes devem ser investigados, mas também aqueles já tradicionalmente estudados ou monitorados necessitam ser reavaliados com o objetivo de proporcionar respostas mais aprimorada sobre a situação dos espaços ambientais.

2.2 – OBJETIVO ESPECÍFICO

- Verificar a presença/ausência de substâncias desreguladoras endócrinas, especificamente os hormônios sexuais estrógenos (17 β -estradiol (E2), estrona (E1) e o sintético 17 α -etinilestradiol (EE2)) nas águas e sedimentos do Rio do Monjolinho.

2.3 – CONSIDERAÇÕES SOBRE OS PROCEDIMENTOS DESENVOLVIDOS

A validação do processo experimental de toda a metodologia aplicada para a análise química dos hormônios estrogênicos foi realizada de maneira conjunta e complementar através do desenvolvimento de trabalho de mestrado com temática direcionada para a otimização das técnicas analíticas utilizadas (consultar a dissertação de DE ARAÚJO, 2006).

Porém algumas observações pertinentes devem ser expostas:

1) Os limites de detecção e quantificação foram estabelecidos experimentalmente através da análise de misturas padrão dos hormônios estudados, adicionados em amostras de água do Rio do Monjolinho e também em preparações de esgoto sintético. Os cálculos realizados através do programa computacional *Validate 1.0* (LANÇAS, 2004) retornaram os valores contidos na Tabela 3.

Tabela 3 - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os hormônios estudados.

Hormônios	LD (mg.L ⁻¹)	LQ (mg.L ⁻¹)
17 β -estradiol (E2)	0,0769	0,231
17 α -etinilestradiol (EE2)	0,0833	0,250
Estrona (E1)	0,0800	0,240

Assim, considerando a pré-concentração de 500 vezes dos analitos, uma vez que 250,0 mL de amostra do rio são submetidas à SPE (extração em fase sólida) em cartuchos de octadecilsilano (C₁₈), resultando em 0,5 mL de

extrato final, a metodologia aplicada, extração em fase sólida e análise em cromatografia líquida com detector de fluorescência (HPLC-Fluorescência), possibilitou a análise de amostras com concentrações de 28,2 ng.L⁻¹ de E2 (estradiol), 240 ng.L⁻¹ de E1 (estrona) e 45 ng.L⁻¹ de EE2 (etinilestradiol). Estes valores a exceção do E1 são mais próximos àqueles encontrados no meio ambiente, porém ainda elevados. Portanto optou-se pelo exame dos hormônios E2 e EE2 nas matrizes obtidas e pela fortificação das amostras com 200 ng.L⁻¹ para assegurar em grau mais elevado a certeza das respostas geradas.

2) A fortificação ou dopagem foi possível devido aos excelentes percentuais de recuperação (média de 102 % para E2 e 99% para EE2) obtidos em estudos prévios com esgoto sintético.

3) Para as duas últimas campanhas de coleta foi incluído um ponto extra, denominado de P3, em razão de obras hidráulicas que estavam ocorrendo no Rio do Monjolinho e também por se tratar de um ponto próximo ao Shopping Center da cidade. Neste local foram notadas visualmente várias manchas de óleo e fluxos de dejetos humanos, sendo anterior ao ponto 4 onde teoricamente 100% dos esgotos são despejados. Coletas de sedimentos também foram efetuadas durante a última campanha amostral.

2.4 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.4.1 – PONTOS DESIGNADOS PARA AMOSTRAGEM NO RIO DO MONJOLINHO

Dentro do sistema de gerenciamento de recursos hídricos do Estado de São Paulo, o qual prioriza a bacia hidrográfica como unidade básica para estudo, planejamento e gerenciamento, a área foco deste estudo esta inserida na unidade UGRHI – 13, denominada de Tietê – Jacaré e qualificada como em processo de industrialização (Lei Estadual nº 9034/94 de 27.12.1994).

A sub-bacia do Rio do Monjolinho situa-se na região centro-norte do Estado, localizada entre os paralelos 21°57' e 22°06' de latitude sul e os meridianos 47° 50' e 48°05' de longitude oeste (IBGE, 1971). O Rio do Monjolinho nasce próximo da periferia da cidade de São Carlos e a cruza no sentido Leste-Oeste, tendo uma extensão de aproximadamente 43,25 Km (SÉ,

1992). Na área urbana é canalizado e recebe a contribuição de diversos tributários e de esgotos domésticos e industriais (ESPÍNDOLA, 2000), sua classificação é de classe 4 pelo Decreto Estadual nº 8648 de 8.9.1976 (SAAE, 2004). De acordo com relatório técnico (CBH-TJ, 2000) 1100 indústrias entre as quais as de alimentos, curtumes, têxtil, metalurgia, papel e tintas são passíveis de contaminar o rio. Após atravessar o centro urbano, o Rio do Monjolinho percorre áreas agropastoris até desaguar em outro curso d'água o rio Jacaré-Guaçu.

A Figura 5 indica precisamente a localização da bacia hidrográfica do rio do Monjolinho e as estações selecionadas para amostragem. A escolha dos locais de amostragem incorporou não somente os processos longitudinais, mas também as influências laterais sobre o rio. Outro fator considerado foi em relação a trabalhos anteriores realizados no ambiente de estudo. Pesquisas nas bibliotecas da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) retornaram trabalhos (dissertações e teses) abordando diferentes aspectos limnológicos, destaques para a obra de ESPÍNDOLA et al., 2000 a qual aborda várias facetas da bacia hidrográfica do Rio do Monjolinho e também para a dissertação pioneira de SÉ, 1992. Assim, na medida do possível, procurou-se a sobreposição dos pontos amostrais para gerarem dados que permitam uma discussão futura mais consistente.

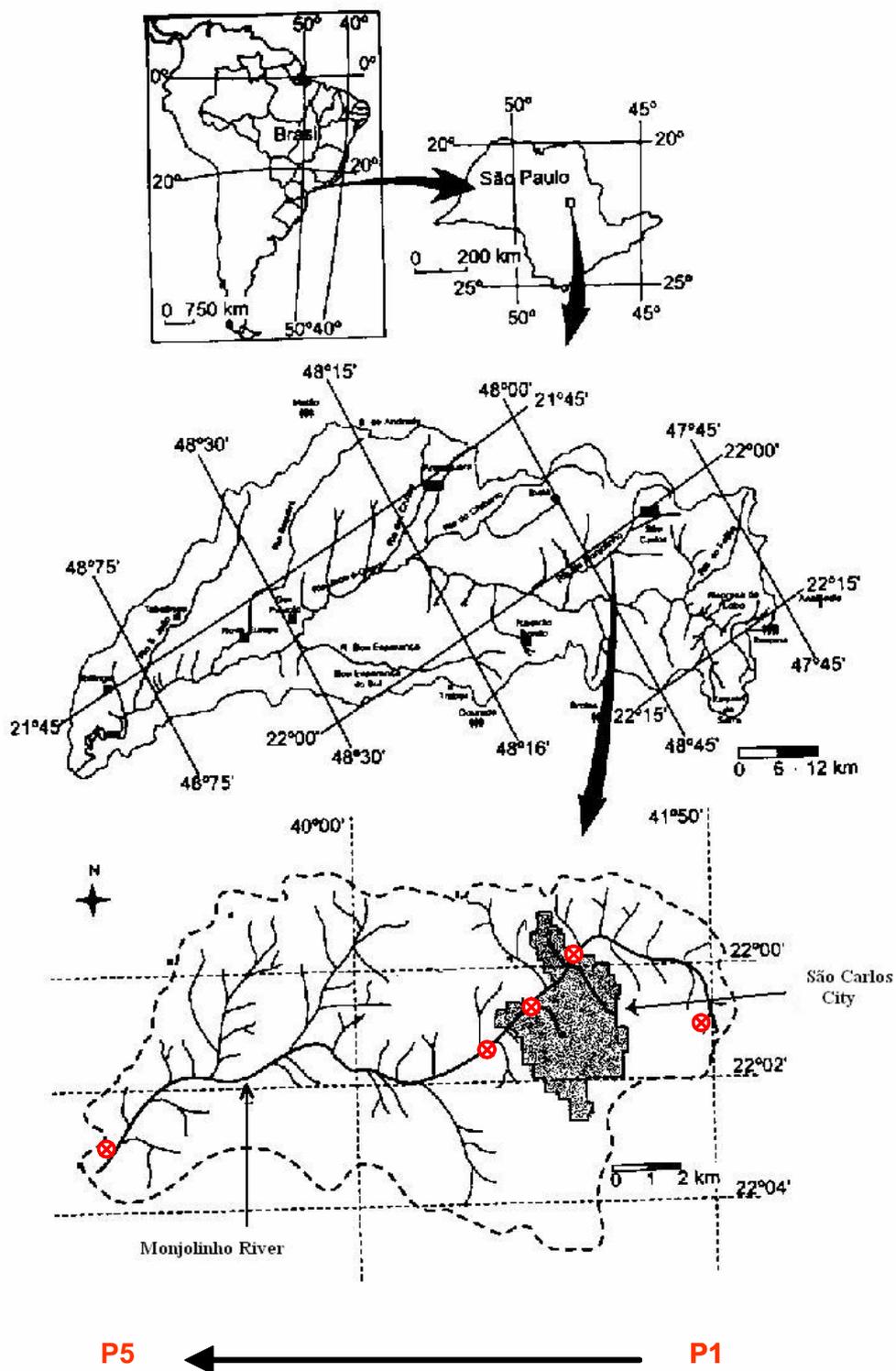


Figura 5 – Localização dos pontos amostrais na bacia hidrográfica do Rio do Monjolinho (Modificado de SÉ, 1999). Setas indica a direção nascente → foz.

PONTO 1: NASCENTE. O Rio do Monjolinho nasce no planalto de São Carlos, a leste do município.

Latitude: 22°00'33" S; Longitude: 47°50'07" O.

PONTO 2: CONFLUÊNCIA. Ponto onde o Rio do Monjolinho recebe a contribuição do córrego tributário Tijuco Preto.

Latitude: 22°00'10.5" S; Longitude: 47°54'00.5" O.

PONTO 3: SHOPPING. Ponto nas imediações do shopping da cidade, no encontro com o tributário Gregório.

Latitude: 22°00'28.3" S; Longitude: 47°54'27.1" O.

PONTO 4: LANÇAMENTO. Ponto onde 100% (teoricamente) dos esgotos domésticos do município são lançados "*in natura*" no rio.

Latitude: 22°01'19.6" S; Longitude: 47°54'50.5" O.

PONTO 5: FOZ. O deságüe do Rio do Monjolinho se dá a oeste do município no rio Jacaré-Guaçu.

Latitude: 22°03'32.2" S; Longitude: 48°05'22.8" O.

2.4.1.2 – Procedimentos para coleta das amostras

A estratégia amostral foi traçada para investigar possíveis alterações na presença e concentração de E2 e EE2 no sentido longitudinal na direção Nascente-Foz. Assim foram efetuadas coletas nos meses de abril e agosto de 2005 e janeiro e setembro de 2006, sempre no período da manhã. As amostras de água foram recolhidas do alto de pontes através do lançamento de balde (Figura 6), exceto para a nascente onde os frascos foram completados diretamente, sendo imediatamente transferidas para frascos âmbar e acidificadas com HCL 40% (1 mL por litro) para cessar a atividade microbiana. Os sedimentos foram coletados manualmente através de pá de inox e acondicionados em frascos plásticos e resfriados. Para complemento do estudo, sonda multieletrodo (Horiba U-10) foi utilizada para obtenção de dados físico-químicos da água. Amostras de água foram separadas para determinações de alguns parâmetros chave em dois dos períodos amostrados.

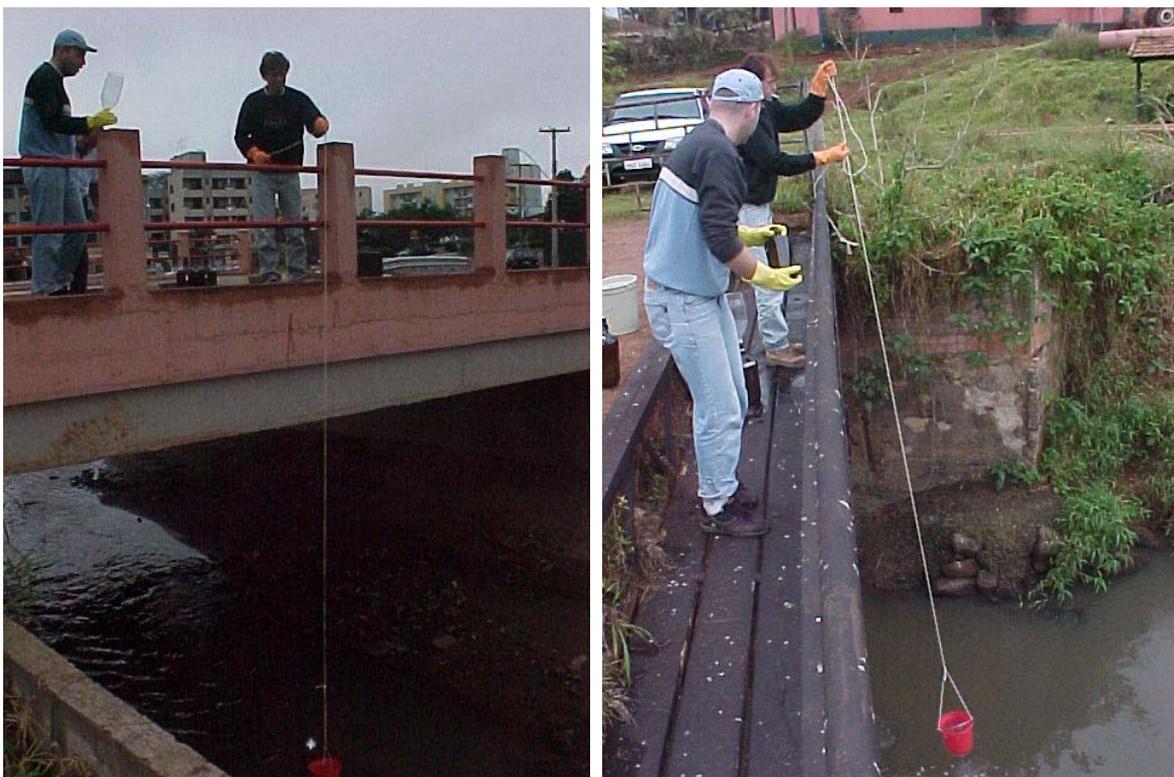


Figura 6 – Amostragem de água em trecho urbano (foto da esquerda) e rural (foto da direita) no Rio do Monjolinho.

2.4.2 – Técnicas de análises químicas

Para a análise dos hormônios, 5 replicatas de cada ponto foram feitas em até 48 horas após a coleta. Os procedimentos seguiram as metodologias propostas por DE ALDA & BARCELÓ, 2001a e GOMES et al., 2003 com algumas modificações. As amostras de água foram filtradas através de filtro de acetato de celulose de porosidade $0,45 \mu\text{m}$ e fortificadas com 200 ng.L^{-1} de E2 e EE2 (Sigma-Aldrich, > 98 % de pureza). Imediatamente 250 mL (cada réplica) foram submetidos a extração em fase sólida (SPE) executada em cartuchos contendo o adsorvente C-18 (500 mg/6mL J.T. Baker Bakerbond) sendo o eluído deste processo conduzido para determinação cromatográfica (Cromatógrafo SLC-10A, Shimadzu) no modo isocrático (acetonitrila/água 48:52) acoplado a detector fluorimétrico (RF-551 Shimadzu). Para os sedimentos foi desenvolvido e otimizado um procedimento analítico baseado em DE ALDA & BARCELÓ, 2001b, PETROVIĆ et al., 2001 e LEE et al., 2003, sendo também avaliados quanto à granulometria (SUGUIO, 1973) e teor de matéria orgânica (TRINDADE, 1980). Apesar de envolver várias etapas de

manipulação da amostra, necessárias para promover a desorção dos analitos, as recuperações testadas em sedimentos dopados com padrões, mostraram a confiabilidade da metodologia a ser utilizada. As condições cromatográficas foram às mesmas das amostras líquidas. Os protocolos analíticos usados para as determinações dos hormônios estrógenos podem ser vistos esquematicamente nas Figuras 7 e 8. Brancos de campo e de laboratório foram processados do mesmo modo das amostras ambientais.

As análises de cloretos, sulfatos, DBO₅ (demanda bioquímica de oxigênio) e coliformes fecais foram conduzidas de acordo com APHA 1998 e DE MACÊDO 2003.

Para propósito estatístico, análise de variância (ANOVA) foi executada em um nível de significância de $p < 0.05$ e testes apropriados de comparações entre médias foram aplicados. Todos os dados são apresentados como média \pm desvio padrão, a menos que outra notação seja especificada.

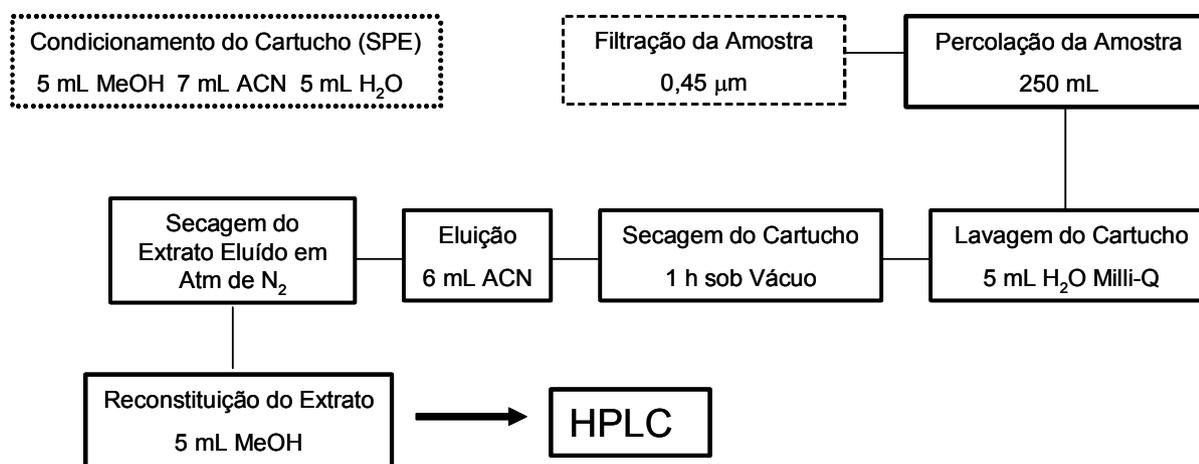


Figura 7 – Fluxograma dos passos usados para a análise dos hormônios estrogênicos nas amostras de água.

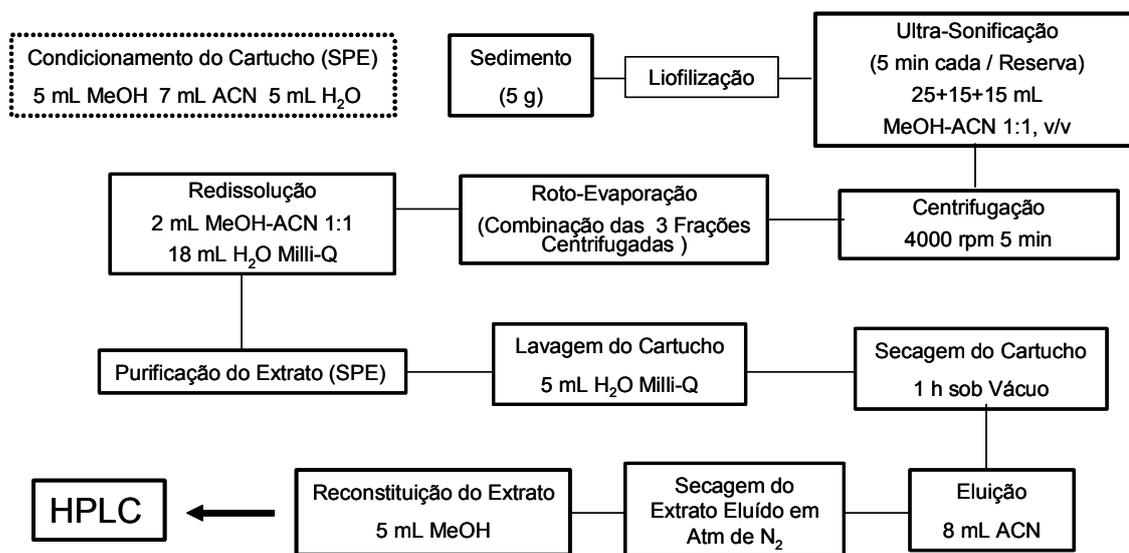


Figura 8 – Fluxograma dos passos usados para a análise dos hormônios estrogênicos nas amostras de sedimentos.

2.5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações do hormônio etinilestradiol (EE2) determinadas nas amostras de água do rio estão sumarizadas na Tabela 4. Somente na última coleta e apenas o ponto 4, foi observada a presença do estradiol E2 na concentração de $27,5 \pm 3,18 \text{ ng.L}^{-1}$. Estes dados possivelmente refletem a maior labilidade do E2, pois sua taxa de degradação é cerca de 10 vezes superior quando comparada à do EE2 (JURGENS et al., 1999, LANGSTON, et al., 2005). A resistência à degradação do EE2 é destacada em artigo recente de JOHNSON et al., 2007 que avalia a eficiência dos métodos disponíveis para tratamento de efluentes. A maior estabilidade à clivagem ou a ação microbiana do hormônio sintético em relação aos naturais (FUJII et al., 2002, WEBER et al., 2005) pode também justificar sua evidência nas águas do Rio do Monjolinho. Ainda, o E2 é facilmente convertido em estrona (E1), seu produto de degradação, (SUIDAN et al., 2005) diminuindo, portanto a concentração de ambos no ambiente e assim necessitando de métodos mais sensíveis para a determinação destes hormônios.

Tabela 4 - Valores médios do hormônio estrógeno sintético etinilestradiol (EE2) encontrados nas campanhas de coleta no Rio do Monjolinho.

Local de Coleta	EE2 Conc. (ng.L ⁻¹)			
	Abril 2005	Agosto 2005	Janeiro 2006	Setembro 2006
P1	nd	nd	nd	nd
P2	21.40 ± 2.03	20.5 ± 2.95	16.7 ± 2.15	11.4 ± 3.30
P3	ND	ND	19.3 ± 1.83	12.1 ± 2.07
P4	29.36 ± 1.38	30.1 ± 3.41	21.9 ± 2.10	18.6 ± 2.73
P5	nd	nd	nd	nd
nd não detectado				
ND não determinado				

Avaliando-se os parâmetros analisados, apenas o pH manteve-se razoavelmente homogêneo entre os pontos (média de 7,06) sendo levemente mais ácido na nascente (média de 6,69). Quanto aos demais, os gráficos (Figuras 9 e 10) indicam nitidamente a existência de alterações entre os pontos amostrais. No escopo desta pesquisa, a agregação destes parâmetros visa ratificar a premissa da perda espacial de atributos do corpo hídrico no sentido da nascente até a foz e não avaliar em detalhes limnológicos as águas do rio, fato já bem documentado entre outros textos em MARINELLI et al., 2000 e NOVELLI, 2005. Neste sentido, os locais selecionados para amostragem apresentaram diferenças acentuadas em comparação ao ponto de coleta na nascente, principalmente os pontos P3 e P4 (área urbana), onde todos os parâmetros apresentaram valores significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$, Teste de Tukey) quando comparados a P1 para ambos os períodos amostrais. Este gradiente de elevação permite inferir uma correlação positiva ou direta entre o aumento das concentrações do EE2 e uma menor qualidade das águas do Rio do Monjolinho. Esta correlação pode ser visualizada através de um fluxograma simples (Figura 11) não sendo causal e sim complementar.

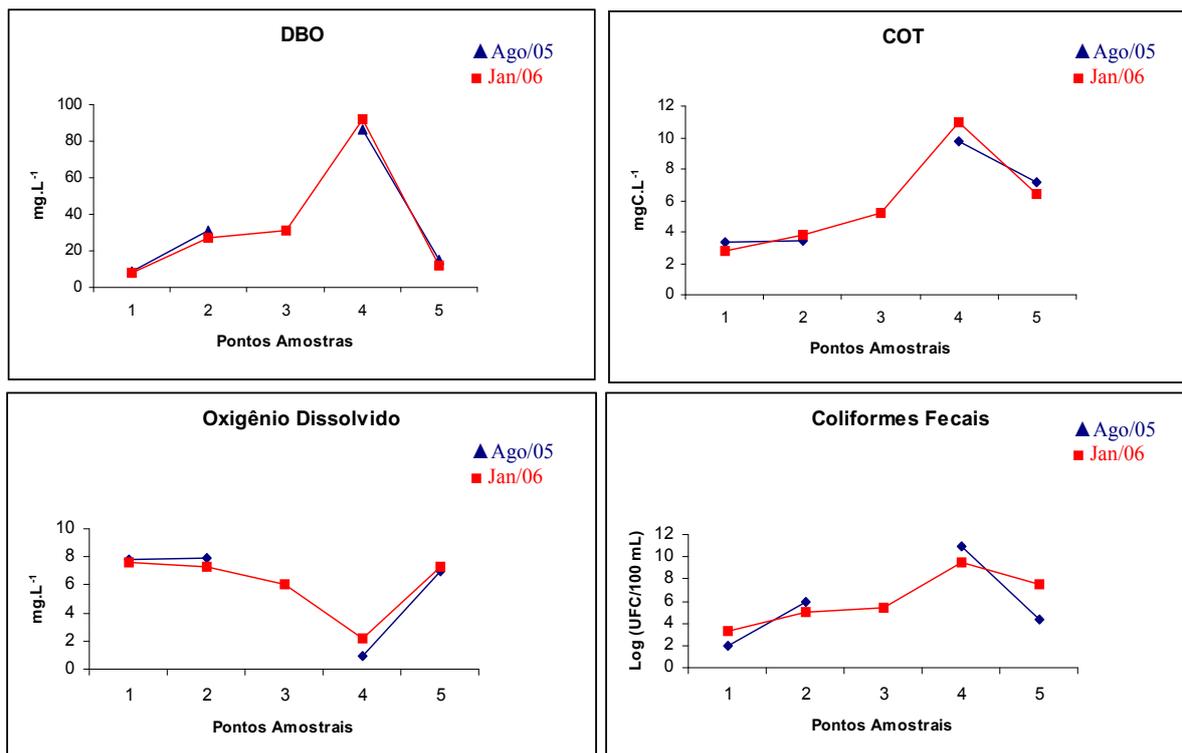


Figura 9 – Valores médios determinados para a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Carbono Orgânico Total (COT), Oxigênio Dissolvido e Coliformes Fecais nas estações de coleta no Rio do Monjolinho nos meses de agosto de 2005 e janeiro de 2006.

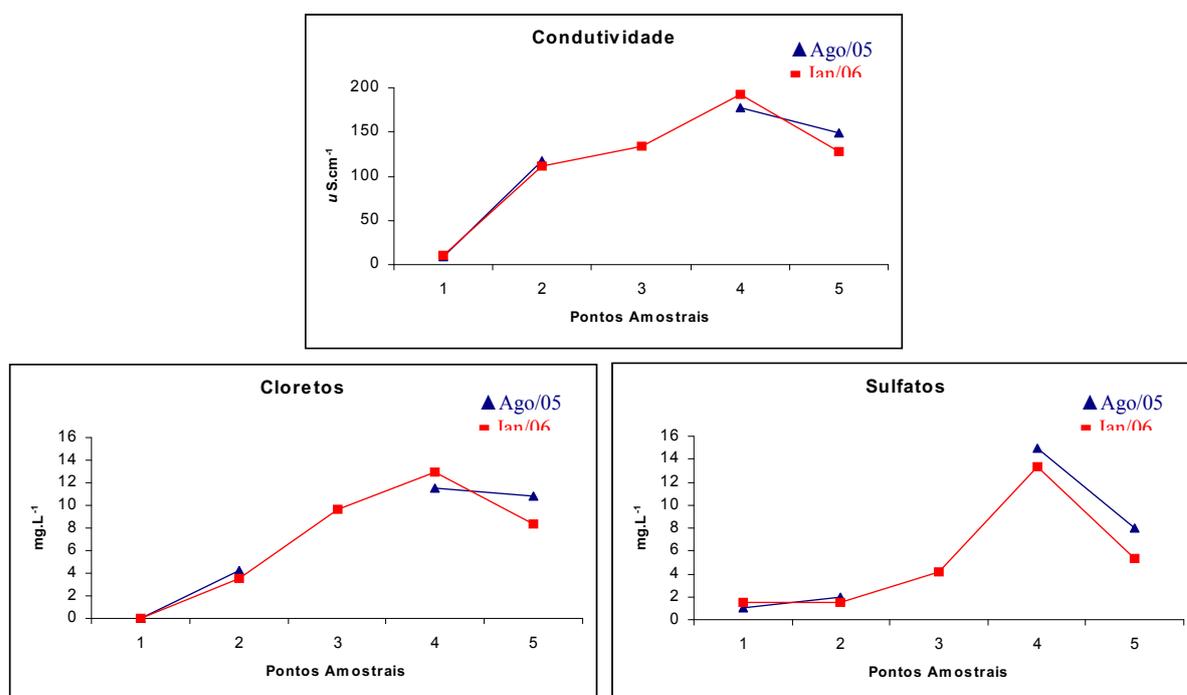


Figura 10 - Valores médios determinados para a condutividade, íons cloreto e íons sulfato nas estações de coleta no Rio do Monjolinho nos meses de agosto de 2005 e janeiro de 2006.

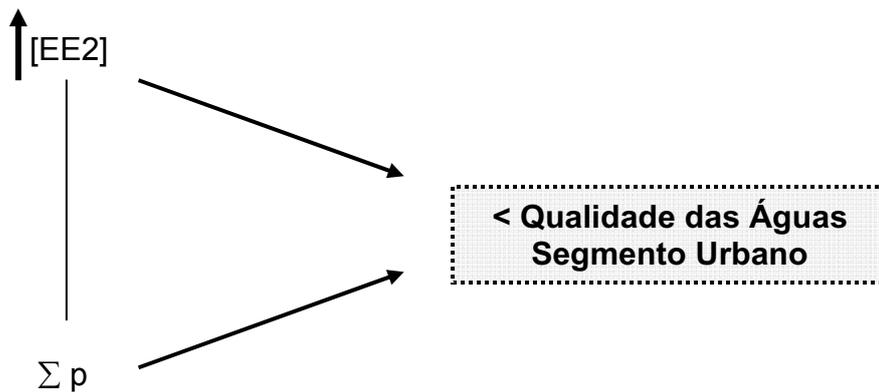


Figura 11 – Correlação entre o aumento das concentrações de etinilestradiol ([EE2]) e somatório dos parâmetros de qualidade de água (Σp) resultando em deterioração das águas do Rio do Monjolinho.

Para os sedimentos coletados em setembro/2006 e apenas as amostras coletadas no ponto P4, verificou-se a presença do EE2 na concentração de $33,10 \pm 3,34 \text{ ng.g}^{-1}$. As características granulométricas e o teor de matéria orgânica são apresentados nas Figuras 12 e 13.

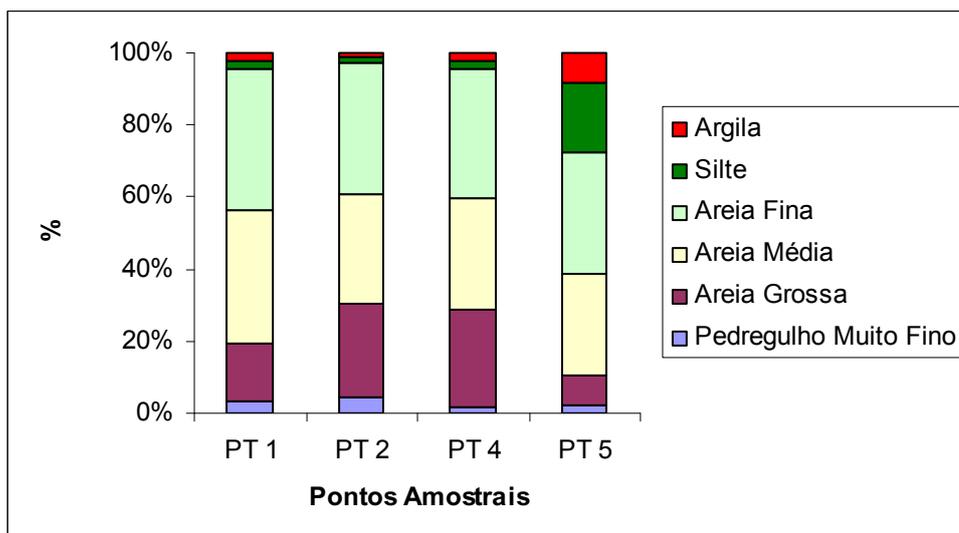


Figura 12 – Composição granulométrica dos sedimentos do Rio do Monjolinho (Coleta 4). Ponto 3 não amostrado por ser constituído de pedregulhos e seixos.

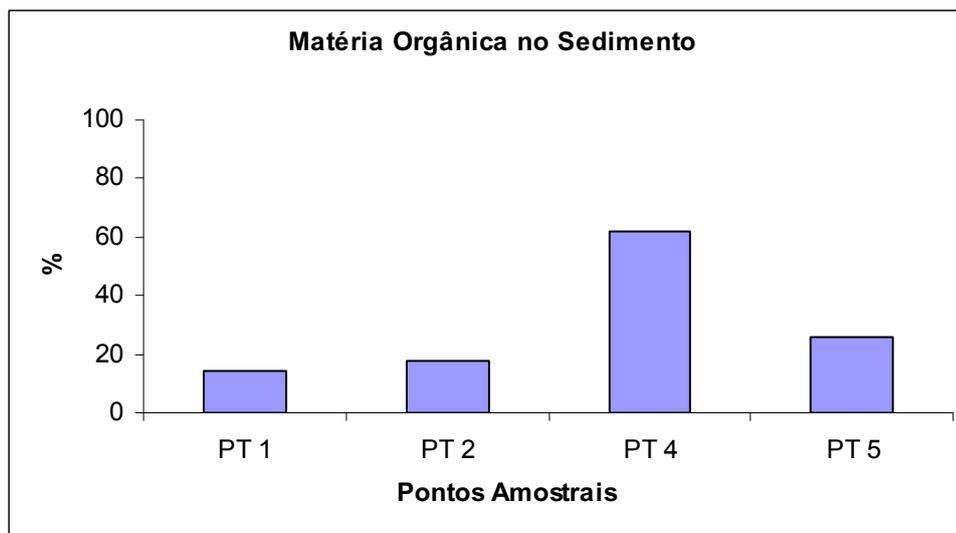


Figura 13 – Teor de matéria orgânica (MO) nos sedimentos do Rio do Monjolinho (Coleta 4). Ponto 3 não amostrado por ser constituído de pedregulhos e seixos.

As características granulométricas dos sedimentos do rio pouco variaram entre as estações amostrais, apenas no ponto 4 pouco antes da confluência com o rio Jacaré-Guaçu as frações de silte e argila estiveram presentes em maior proporção. A grande quantidade de matéria orgânica presente neste ponto amostral, permitiu classificar os sedimentos como orgânicos (ESTEVES, 1988), é interessante observar que mesmo tendo partículas mais grosseiras os teores de MO são elevados principalmente no sentido montante-jusante. Este fato provavelmente decorre da influência antropogênica possivelmente relacionada ao lançamento de esgotos sanitários e alterações às margens do rio que provocam desagregação e fluxos de materiais para as águas.

Embora a concentração de EE2 encontrada no Rio do Monjolinho (máximo de $33,51 \text{ ng.L}^{-1}$), estejam acima dos valores comumente reportados na literatura internacional ($< 10 \text{ ng.L}^{-1}$) para rios e efluentes (LANGSTON et al., op. cit. e KUSTER et al., 2005), os níveis estão de acordo com locais particularmente suscetíveis a contaminação (pequenos rios com desembocadura de esgotos *in natura*).

Dentre importantes estudos que apresentaram esta mesma magnitude para EE2, destacam os de SHEN et al., 2001 com $30,8 \text{ ng.L}^{-1}$ no delta do

Yangtze (China); o de DE ALDA & BARCELÓ, op. cit. que avaliaram sedimentos da região da Catalunha (Espanha) e constataram concentrações de até $22,8 \text{ ng.g}^{-1}$. KOLPIN et al., 2002 em uma ampla investigação de rios impactados nos Estados Unidos encontrou concentrações médias de 94 ng.L^{-1} . POJANA et al., 2004 ao estudarem algumas estações da lagoa de Veneza (Itália) encontraram concentração de 34 ng.L^{-1} ; e o de BAREL-COHEN et al., 2006 que reporta concentrações acima de 40 ng.L^{-1} para alguns tributários do rio Jordão (Israel) com elevados valores de DBO.

A DBO e os coliformes fecais são indicadores tradicionais da contaminação e rios por esgotos, portanto no segmento urbano do Rio do Monjolinho, especificamente nos pontos P3 e P4, onde estes valores foram máximos, é confirmada a existência desta importante fonte de poluentes. De acordo com a CETESB, 2004 e SUÁREZ & PUERTAS, 2005 corpos d'água impactados por lançamentos de efluentes apresentam valores elevados destes parâmetros, incluindo-se os íons cloreto e sulfato. Desta forma, estes parâmetros também podem indicar de modo indireto a possibilidade de existência de hormônios devido a sua fonte de origem em comum.

Registros nacionais vinculando hormônios estrogênicos como contaminantes são muito raros. O trabalho de TERNES et al., 1999 parece ser o pioneiro, e até então exclusivo, nesta área onde são relatadas as percentagens de estrogênicos presentes na ETE de Penha no Estado do Rio de Janeiro e seu comportamento durante as fases de tratamento. Porém em se tratando do ambiente, apenas recentemente estudos vêm sendo desenvolvidos. Na região de Campinas/SP em tese de doutorado Ghiselli encontrou concentrações altamente expressivas de vários interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos, tendo o EE2 alcançado valores entre $1,2 - 3,5 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ para água superficial de rios e de $1,6 - 1,9 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ em água potável (GHISELLI, 2006). No mesmo grupo de pesquisa SODRÉ et al., 2007 reportaram concentrações máximas de até 2510 ng.L^{-1} para E2 e 310 ng.L^{-1} para EE2 em pontos amostrais localizados na bacia do rio Atibaia.

Nestes dois últimos levantamentos as concentrações descritas são atípicas, não encontrando par em nenhuma região do mundo até agora avaliada. Todavia talvez algumas considerações possam ser aplicadas para auxiliar na interpretação destes dados (principalmente para o EE2), e também

para os encontrados no Rio do Monjolinho (embora em comparação estes sejam bem menores). Assim temos:

1) O déficit em saneamento (infra-estrutura e tecnologias) com o Brasil tendo cerca de 80% dos seus municípios sem tratamento de esgotos (IBGE, 2004) o que acarreta a contaminação direta dos corpos hídricos recebedores deste passivo;

2) O EE2 é utilizado em terapias de reposição hormonal e como principal componente em pílulas contraceptivas (ARIE, 2004) e segundo estudos de JOHNSON & WILLIAMS 2004, 40% das doses ingeridas nos anticoncepcionais chegam até os esgotos aumentando, portanto a carga destes agentes nas águas residuárias e, por conseguinte no ambiente;

3) De acordo com dados do IMS Health (2006), entre os 10 medicamentos mais vendidos no Brasil, em milhões de toneladas, 4 são anticoncepcionais.

Já especificamente para São Carlos, temos uma cidade dita universitária onde teoricamente o uso de anticoncepcional é alto, principalmente na faixa etária abaixo dos trinta anos (VIEIRA, 2001). Logo, pode-se inferir que a conjunção de vários fatores, em maior ou menor grau, contribui para que a concentração de hormônios seja mais elevada em determinados locais quando comparado a outros em situações dessemelhantes.

2.6 – REFERÊNCIAS

APHA (American Public Health Associations). 1998. Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater. AWWA/WEF, 1328p.

ARIE, W.M.Y., ARIE, M.H.A., DA FONSECA, A.M., HALBE, H.W., BAGNOLI, V.R. 2004. Estrogênios. In: DA FONSECA, A.M., BAGNOLI, V.R., HALBE, H.W., PINOTTI, J.A. (eds.) Ginecologia Endócrina - Manual de Normas. Editora Roca. pp.1-27.

BAREL-COHEN, K., SHORE, L.S., SHEMESH, M., WENZEL, A., MUELLER, J. & KRONFELD-SCHOR, N. 2006. Monitoring of natural and synthetic hormones in a polluted river. J. Environ. Management, 78: 16-23.

CBH-TJ (Comitê de Bacia Hidrográfica Tietê-Jacaré). 2000. Diagnóstico da Bacia Hidrográfica do Tietê-Jacaré "Relatório Zero". 319p.

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). 2004. Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo. 264p.

DE ALDA, M.J.L. & BARCELÓ, D. 2001a. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line solid-phase extraction – liquid chromatography – diode array detection. *J. Chromatogr. A*, 911: 203-210.

DE ALDA, M.J.L. & BARCELÓ, D. 2001b. Use of solid-phase extraction in various of its modalities for sample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water. *J. Chromatogr. A*, 938: 145-153.

DE ARAÚJO, J.C. 2006. Estudo da eficiência do tratamento de efluentes domésticos de Araraquara-SP na remoção de hormônios sexuais. Instituto de Química de São Carlos (IQSC), (Dissertação). 70p.

DE MACÊDO, J.A.B. 2003. Métodos Laboratoriais de Análises Físico-Químicas e Microbiológicas. CRQ-MG, 616p.

ESPÍNDOLA, E.L.G. 2000. O rio do Monjolinho: um estudo de caso. In: ESPÍNDOLA, E.L.G., SILVA, J.S.V., MARINELLI, C.E., ABDON, M.M. (orgs.). *A Bacia Hidrográfica do Rio do Monjolinho*. Rima. pp. 36-40.

ESPÍNDOLA, E.L.G., SILVA, J.S.V., MARINELLI, C.E., ABDON, M.M. (orgs.). 2000. *A Bacia Hidrográfica do Rio do Monjolinho*. Rima. 188p.

ESTEVES, F.A. 1998. Fundamentos de Limnologia. Interciência. 602p.

FIELD, J.A., JOHNSON, C.A., ROSE, J.B. 2006. What is “emerging”? *Environ. Sci. Technol.*, 40(23):7105.

FUJII, K., KIKUCHI, S., SATOMI, M., USHIO-SATA, N., MORITA, N. 2002. Degradation of 17 β – estradiol by a gram-negative bacterium isolated from activated sludge in a sewage treatment plant in Tokyo, Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4): 2057-2060.

GHISELLI, G. 2006. Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: Ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP). Universidade de Campinas, (Tese). 181p.

GOMES, R.L., SCRIMSHAW, M.D. & LESTER, J.N. 2003. Determination of endocrine disrupters in sewage treatment and receiving waters. *Trends Anal. Chem.*, 22(10): 697-707.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 1971. Carta Cartográfica do Brasil. Folhas: Araraquara, Ibaté, Ribeirão Bonito e São Carlos. Mapas.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 2004. Atlas do Saneamento. 151p.

IMS Health (2006). Ranking dos Campeões: Os remédios mais vendidos no Brasil em milhões de toneladas. Revista Época em 18 de Setembro de 2006.

JOHNSON, A.C., WILLIAMS, R.J., SIMPSON, P., KANDA, R. 2007. What difference might sewage treatment performance make to endocrine disruption in rivers? *Environmental Pollution*, 147: 194-202.

JURGENS, M.D., WILLIAMS, R.J., JOHNSON, A.C. 1999. Fate and Behavior of Steroidal Oestrogens in Rivers: A scoping study. R&D Technical Report P161 (U.K. Environment Agency). 80p.

JOHNSON, A.C. & WILLIAMS, R.J. 2004. A model to estimate influent and effluent concentrations of estradiol, estrone, and ethinylestradiol at sewage treatment works. *Environ. Sci. Technol.*, 38: 3649-3658.

KOLPIN, D.W., FURLONG, E.T., MEYER, M.T., THURMAN, E.M., ZAUGG, S.D., BARBER, L.B. & BUXTON, H.T. 2002. Response to comment on "Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance". *Environ. Sci. Technol.*, 36: 4007-4008.

KUSTER, M., De ALDA, M.J.L., BARCELÓ, D. 2005. Estrogens and progestogens in wastewater, sludge, sediments, and soil. In: BARCELÓ, D. (editor). *The Handbook of Environmental Chemistry Vol 5, Part O*. Springer-Verlag. pp. 1-24.

LANÇAS, F. L. Validação de Métodos Cromatográficos de Análise. 2004. Rima. 46p.

LANGSTON, W.J., BURT, G.R., CHESMAN, B.S., VANE, C.H. 2005. Partitioning, bioavailability and effects of oestrogens and xeno-oestrogens in the aquatic environment. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 85: 1-31.

LEE, L.S., STROCK, T.J., SARMAH, A.K., RAO, P.S.C. 2003. Sorption and dissipation of testosterone, estrogens, and their primary transformation products in soil and sediment. *Environ. Sci. Technol.*, 37: 4098-4105.

Lei Estadual N° 9034/94 de 27.12.1994 – Plano Estadual de Recursos Hídricos (PERH). São Paulo – SP.

LUBOVICH, K. 2005. Emerging environmental contaminants: Much debate, little consensus. *WE&T*, 17(9): 30-33.

MARINELLI, C.E., MORETTO, E.M., BRUCHA, G., LUCCA, J.V. 2000. Limnologia. In: ESPÍNDOLA, E.L.G., SILVA, J.S.V., MARINELLI, C.E., ABDON, M.M. (orgs.). *A Bacia Hidrográfica do Rio do Monjolinho*. Rima. pp. 133-149.

NOVELLI, A. 2005. Estudo limnológico e ecotoxicológico da água e sedimento do Rio do Monjolinho – São Carlos (SP), com ênfase nas substâncias de referência cádmio e cobre. Escola de Engenharia de São Carlos, (Dissertação). 211p.

PETROVIĆ, M., ELJARRAT, E., De ALDA, M.J.L., BARCELÓ, D. 2001. Analysis and environmental levels of endocrine-disrupting compounds in freshwater sediments. *Trends Anal. Chem.*, 20(11): 637-648.

POJANA, G., BONFÀ, A., BUSETTI, F., COLLARIN, A. & MARCOMINI, A. 2004. Estrogenic potential of the Venice, Italy, Lagoon waters. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23(8): 1874-1880.

RAJAPAKSE, N., SILVA, E., KORTENKAMP, A. 2002. Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environ. Health. Perspect.*, 110: 917-921.

RICHARDSON, S.D. & TERNES, T.A. 2005. Water analysis: Emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.*, 77(12): 3807-3838.

SÉ, J.A.S. 1992. O rio Monjolinho e sua bacia hidrográfica como integradores de sistemas ecológicos. Um conjunto de informações para o início de um processo de pesquisas ecológicas, de educação, planejamento e gerenciamento ambientais a longo prazo. Escola de Engenharia de São Carlos, (Dissertação). 381p.

SÉ, J.A.S. 1999. Educação ambiental nas bacias hidrográficas do Rio do Monjolinho e do rio Chibarro: Ciência, educação e ação nos quotidianos de São Carlos e Ibaté (SP). Escola de Engenharia de São Carlos, (Tese). 254p.

SAAE (Serviço Autônomo de Água e Esgoto de São Carlos). 2004. Projeto Básico da Estação de Tratamento de Esgotos do Monjolinho (Volume 1- Memoriais). 274p.

SERVOS, M.R. & SERVOS, M.C. 2006. Emerging chemicals derived from municipal wastewater. CRD Scientific and Technical Review Panel. 40p.

SHEN, J.H., GUTENDORF, B., VAHL, H.H., SHEN, L. & WESTENDORF, J. 2001. Toxicological profile of pollutants in surface water from an area in Taihu Lake, Yangtze Delta. *Toxicology*, 166: 71-78.

SILVA, E., RAJAPAKSE, N., KORTENKAMP, A. 2002. Something from “nothing” – eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ. Sci. Technol.*, 36: 1751-1756.

SODRÉ, F.F., MONTAGNER, C.C., LOCATELLI, M.A.F., JARDIM, W.F. 2007. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas

superficiais da região de Campinas (SP, Brasil). *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, 2(2): 187-196.

SUÁREZ, J. & PUERTAS, J. 2005. Determination of COD, BOD, and suspended solids loads during combined sewer overflow (CSO) events in some combined catchments in Spain. *Ecological Engineering*, 24: 201-209.

SUGUIO, K. 1973. *Introdução a Sedimentologia*. Edgar Blücher/EDUSP. 317p.

SUIDAN, M.T., ESPERANZA, M., ZEIN, M., McCAULEY, P., BRENNER, R.C., VENOSA, A.D. 2005. Challenges in biodegradation of trace organic contaminants – gasoline oxygenates and sex hormones. *Water Environment Research*, 77(1): 4-11.

TERNES, T.A., STUMPF, M., MULLER, J., HABERER, K., WILKEN, R.D. & SERVOS, M. 1999. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants-I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci. Total Environ.*, 225: 81-90.

TRINDADE, M. 1980. *Nutrientes em sedimento da represa do Lobo (Brotas/Itirapina, SP)*. Universidade Federal de São Carlos, (Dissertação). 219p.

VIEIRA, E.M., BDIANI, R., Dal FABRO, L., RODRIGUES Jr., A.L. 2001. Características do uso de métodos anticoncepcionais no Estado de São Paulo. *Rev. Saúde Pública*, 36(3): 263-270.

WEBER, S., LEUSCHNER, P., KÄMPFER, P., DOTT, W., HOLLENDER, J. 2005. Degradation of estradiol and ethinyl estradiol by activated sludge and by a defined mixed culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67: 106-112.

CAPÍTULO 3: BIOLOGIA MOLECULAR

3.1 – INTRODUÇÃO

Aquisições de respostas em níveis celulares e sub-celulares é um importante ramo da ecotoxicologia moderna. A procura por biomarcadores de exposição e efeitos decorrentes do contato com substâncias variadas tem se tornado cada vez mais freqüente e mesmo imprescindível em muitos estudos de avaliação e monitoramento que se utiliza de organismos como indicadores das condições ambientais.

Os poluentes podem afetar os sistemas biológicos em vários níveis, porém todos inicialmente atuam alterando propriedades estruturais e/ou funcionais de moléculas essenciais para as atividades celulares (JAGOE & NEWMAN, 1996). Estas mudanças que em primeiro plano afetam as organelas e células desencadeiam uma série de efeitos que podem resultar até em alterações em níveis superiores de organização (ARUKWE, 2001). Na Figura 14 é esquematizada esta “transferência hierárquica” de efeitos em peixes expostos a ED.

Nesta razão, amostras de sangue e tecidos de exemplares de peixes capturados em campanhas efetuadas no Rio do Monjolinho foram recolhidas com o intuito de se verificar alterações decorrentes da presença de substâncias estrogênicas no ambiente fluvial.

3.1.1 – Animais e Pesquisa: Responsabilidade Ética

Cada forma de vida é o bem supremo para si mesma.

(Rubem Alves)

O respeito para com os animais experimentais (animais-testes ou cobaias) é uma regra vital para o desenvolvimento de pesquisas centradas em princípios éticos. Em 1789, Jeremy Bentham (de acordo com ZURLO, et al., 1994) escrevia: “A questão, não é se os animais têm a capacidade de raciocinar ou mesmo comunicar, mas sim de sofrer?”.

A utilização de organismos em pesquisas tem permitido o avanço em diversas áreas do saber. Nas ciências ambientais, particularmente em estudos ecotoxicológicos, ela é fundamental, pois a análise química isolada não pode determinar a toxicidade para a matéria viva. Sendo a saúde dos organismos um reflexo direto da qualidade do ambiente (BROWDER, 1988). Em relação

aos peixes, dois trabalhos recentes e opostos têm gerado vigorosas discussões. ROSE, 2002 argumenta que a ausência de certas estruturas cerebrais torna os peixes incapazes de sentir medo ou mesmo dor, por outro lado, SNEDDON et al., 2003 através de experimentos comportamentais e respostas nervosas concluíram que os peixes “experimentam” dor. CHANDROO et al., 2004 fazem uma importante revisão sobre a questão, abordando vários aspectos que permeiam os trabalhos citados.

Os peixes, enquanto vertebrados, possuem um sistema nervoso desenvolvido e com várias terminações que se distribuem ao longo do corpo (SCHIMDT-NELSON, 1990), estando desta forma suscetível a insultos diversos. Como a dor é uma percepção, e, portanto sem dimensão física (KITCHELL & JOHNSON, 1985) sua definição mesmo em termos humanos torna-se relativa. Assim, embora não possamos conhecer exatamente como um animal “experimente” ou perceba a dor, rege o bom senso, considerar qualquer estímulo que “nós” humanos aceitaríamos como dor, passível de infringir sofrimento aos organismos.

Importantes sociedades científicas como a American Society of Ichthyologists and Herpetologists (ASIH), a American Fisheries Society (AFS), e o American Institute of Fisheries Research Biologists (AIFRB) já em 1988 denotavam preocupação quanto às formas de conduzir pesquisas envolvendo peixes, elaborando um manual de procedimentos (ASIH, AFS, AIFRB, 1988). Sentindo a necessidade de uma abordagem mais ampla em relação aos cuidados (bem-estar) para com os peixes em pesquisas, o Canadian Council on Animal Care (CCAC), organização canadense que gerencia a proteção aos animais, elaborou um “guideline” detalhado que sistematiza os cuidados a serem observados no emprego de peixes em pesquisas (CCAC, 2005).

O princípio dos “3Rs – Reduce, Refine, Replace”¹ deve, na medida do possível, também ser aplicado em experimentos envolvendo animais aquáticos visando diminuir a quantidade de sacrifícios necessários para obterem-se respostas. Como CAIRNS, 2003, propriamente enfatiza a utilização de qualquer forma de vida em pesquisa só deve ser concebida com a expectativa que seja benéfica; ou remontando a ARISTÓTELES: “Toda arte e toda investigação, bem como toda ação e toda escolha, devem visar a um bem.”

¹ Disponível em: <http://grants.nih.gov/grants/policy/regulatoryburden/animalcare.htm>, Acessada em 10/01/2005

Frente ao exposto fica manifesto que todos os procedimentos científicos adotados nesta pesquisa seguiram normas que assegurassem práticas dignas para com os organismos capturados.

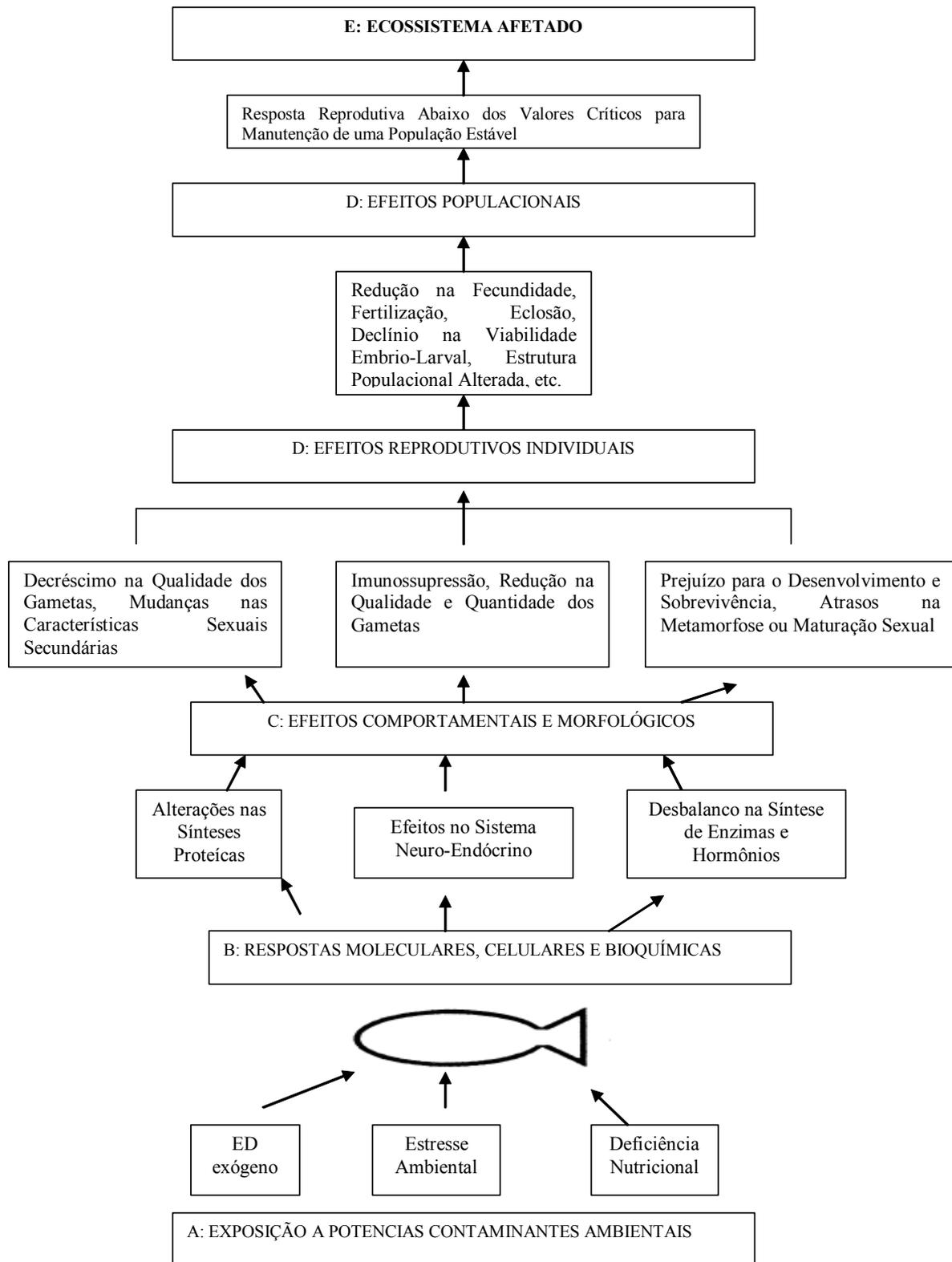


Figura 14 - Visualização sequencial dos efeitos desencadeados devido à exposição à contaminantes. No esquema fica evidenciada a importância das respostas moleculares como “sinais precoces de efeitos” (early warning signals) para todo o sistema. (Adaptado de ARUKWE, 2001).

3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se algumas espécies de peixes, que habitam as águas do Rio do Monjolinho, apresentam indícios de efeitos devido à contaminação por compostos desreguladores endócrinos.
- Desenvolver uma técnica em biologia molecular que propicie a avaliação de exposição à DE (biomarcador Vtg mRNA) para a tilápia *Oreochromis niloticus*.

3.3 – CONSIDERAÇÕES SOBRE OS PROCEDIMENTOS DESENVOLVIDOS

Nesta etapa da pesquisa duas linhas de análise foram aplicadas em razão da busca por respostas mais aprimoradas. Assim, como em uma varredura inicial de indícios de efeitos, técnicas eletroforéticas foram aplicadas em alíquotas de sangue dos peixes mais comumente capturados nas águas do Rio do Monjolinho. Posteriormente, devido a reavaliações dos resultados até então obtidos, ficou patente a necessidade de um significativo refinamento para caracterização em grau elevado dos efeitos desencadeados por substâncias estrogênicas no ambiente investigado. Portanto, a reação em cadeia de polimerase reversa (RT-PCR) foi aplicada em tecidos hepáticos para a tilápia *Oreochromis niloticus*, organismo selecionado como biomonitor.

Deve-se frisar que embora os métodos de biologia molecular utilizados sejam bem definidos e de uso comum nos laboratórios credenciados para estas análises de alta tecnologia, a metodologia desenvolvida e direcionada para estudos ambientais em ecossistemas aquáticos brasileiros associados à contaminação por desreguladores endócrinos possui ineditismo.

3.4 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.4.1 – Captura dos Peixes

Duas coletas, Outubro de 2004 e Janeiro de 2005, foram realizadas através de tarrafas (malha fina de 3 mm entre nós) na área urbana do Rio do Monjolinho (pontos arbitrários em função da suspeita da presença de esgotos lançados de forma clandestina) para obtenção de espécimes de peixes visando estudos com a proteína vitelogenina (Figura 15). Inicialmente apenas 4 exemplares machos de *Oreochromis niloticus* foram obtidos em um total de 20 recolhidos para a espécie, sendo também obtidos exemplares de acarás (*Geophagus brasiliensis*) e cascudos (*Hipostomus regani*). Na segunda coleta, em um esforço amostral mais direcionado foram priorizados indivíduos da família Cichlidae (15 Machos : 4 Fêmeas de *O. niloticus* e 4 M : 2 F de *G. brasiliensis*). Como área controle foi amostrada uma pequena lagoa situada em propriedade rural isenta de esgotos (Figura 15) onde 15 peixes foram também capturados.

Chegando ao laboratório os peixes foram anestesiados (Figura 16) com benzocaína na concentração de 250 mg.L⁻¹ propiciando a extração de sangue sem impingir dor aos animais (NOGA, 1996). A extração foi executada em seringas de 3 mL heparinizadas (Liquemine-Roche) através de inserção da agulha na veia caudal ou lamelas branquiais (Figura 16). O material foi transferido para tubos especialmente preparados para evitar coagulação e/ou proteinase com 10 µL de heparina e 2µL de aprotinina (Bayer). As amostras foram centrifugadas (5000g / 8 min) e o plasma sobrenatante retirado e conservado em -20° C (adaptações dos procedimentos propostos por TYLER, et al., 1996 e ISHIBASHI, et al., 2001). Após a coleta de sangue os peixes foram medidos e pesados para então serem submetidos à eutanásia pelo deslocamento da cervical. Através de incisões ventrais (Figura 16) os fígados foram retirados, pesados e mantidos em nitrogênio líquido até serem fatiados e partes estocadas em freezer a -80° C.



Figura 15 - Amostragem de peixes em trecho urbano do Rio do Monjolinho (foto esquerda) e em área controle na zona rural (foto direita).



Figura 16 - Em sentido horário: peixe sob anestesia, medida em ictiomômetro, retirada de sangue e obtenção de tecidos hepáticos.

3.4.2 – Determinações em Eletroforese

A eletroforese é uma técnica de grande poder informativo, basicamente consiste na migração de moléculas ionizadas em um determinado meio, de acordo com suas cargas elétricas e massas moleculares sob a influência de uma diferença de potencial. A carga líquida das moléculas é função somatória dos aminoácidos que as constituem (BRAMMER, 2001). Uma vez que cada molécula possui sua própria carga e seu próprio tamanho, ela se deslocará sempre numa determinada distância de campo elétrico num dado espaço de tempo. Assim, se uma amostra for submetida à eletroforese, espera-se que cada molécula se concentre numa estreita faixa (banda) no gel (BRAMMER, op. cit.). Na Figura 17 é mostrada a cuba eletrolítica para migração das amostras e também um esquema do zimograma (conjunto das bandas nos géis).

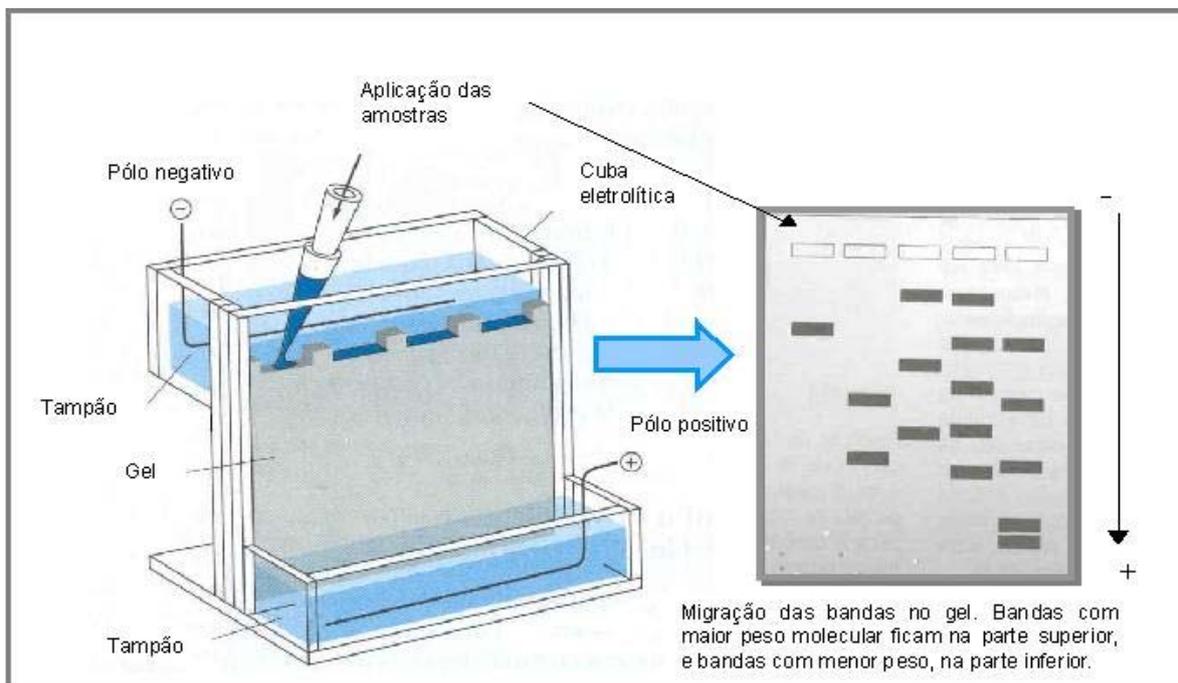


Figura 17 - Método de eletroforese para identificação de proteínas (Fonte: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do05.htm, Embrapa Trigo, acessada em Abril de 2003).

O sistema de eletroforese selecionado para ser aplicado, após vários estudos prévios, foi o desnaturante na presença do detergente dodecil sulfato de sódio ("sodium dodecyl sulfate") na concentração de acrilamida de 12 % (PAGE-SDS). Os protocolos de preparação dos géis, incubação, aplicação das amostras, corrida eletroforética e revelação seguiram o método LAEMMLI exatamente como descrito em detalhes em DA SILVA JUNIOR, 2001. Brevemente, as amostras de corrida foram preparadas com: 10 μL de plasma + 20 μL H_2O milliQ + 15 μL de solução tampão com β -Mercapto-ethanol; desnaturadas por aquecimento (100 $^\circ\text{C}$) por 5' para rompimento das ligações dissulfeto; aplicadas aos poços em alíquotas de 5 μL e submetidas a tensão de 120 volts com tempo de corrida sendo de 1h:30'. Juntamente com as amostras, marcadores de massa molecular específicos (669 KDa – 67 KDa) também foram aplicados para serem comparados aos plasmas dos peixes investigados. Após coloração com "coomassie brilliant blue" as bandas foram identificadas. As Figuras de 18 até 20 ilustram algumas destas etapas.



Figura 18 - Fonte indutora de tensão ligada a uma das cubas eletrolíticas onde são efetuadas as corridas eletroforéticas.

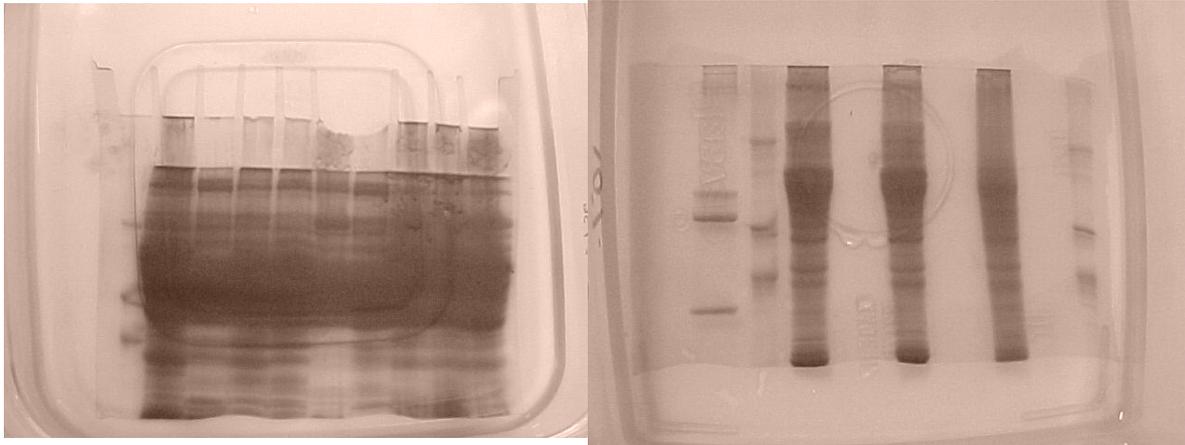


Figura 19 - Géis resultantes durante o processo de revelação após corrida eletroforética. No lado esquerdo da figura observa-se a falta de separação entre as bandas geradas, no lado direito após condições otimizadas vemos a alta resolução obtida.



Figura 20 - Processo de coloração dos géis com “coomassie brilliant blue” em mesa agitadora para caracterização das bandas protéicas.

3.4.3 – Captura dos Peixes e Determinações em RT-PCR

Para aprimoramento dos resultados anteriores, nova campanha de coleta foi planejada e executada em Fevereiro de 2006 para captura de exemplares de tilápias (*Oreochromis niloticus*) no Rio do Monjolinho e área controle (Lago em propriedade rural). Assim, percorreu-se o rio, e através de tarrafa 15 tilápias foram amostradas ao longo do trecho urbano, sendo que na área controle 5 peixes foram recolhidos.

Com o intuito de desenvolver e implementar uma rotina funcional de detecção de um biomarcador relacionado diretamente a genética do animal em estudo, a técnica de RT-PCR (“Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction”) foi selecionada para a determinação da expressão do mensageiro do ácido ribonucléico da vitelogenina (Vtg mRNA) dos peixes capturados no Rio do Monjolinho. Pois tanto o Vtg mRNA como a proteína Vtg a ser originada são produtos de uma mesma via que se inicia com a ativação do gene na presença de estrógenos, sendo desta forma biomarcadores específicos de desregulação endócrina.

Para prosseguimento dos experimentos de análise da expressão da Vtg através do mRNA, foi necessário o levantamento das seqüências de proteínas Vtg depositadas em bancos de genes. Para tanto se acessou o GenBank, através do endereço www.ncbi.nlm.gov. As buscas retornaram os seguintes resultados:

1) Definição: *Oreochromis mossambicus* Partial mRNA for Vitellogenin (vtg gene).

Título: The Expression of Selected Sex-linked Genes in *Oreochromis mossambicus* (Tilapia freshwater fish), as Endpoints to Study Endocrine Disrupting Activity in South African Water Resources.

Autor: Esterhuyse, M.M.

Sequência de nucleotídeos:

TCGAGCTGGGGTTAAAATCCGGGGCAAAGTTTGTATCAGTGCAACAAGTGCCAACGACTACATTCTGAAGCTTGTAGACCC
 TCAGTTGCTGGAGTACAGTGGCATCTGGCCCAAAGATCCTTCCATCCAGCCACCAAGCTCACCCTGCCCTGGCTACTCA
 GCTCTCGACACCGATCAAGTTGAGTATACAAACGGCGTTGTGGGAGACTGGCTGCACCTCCTGGGGTCTCCACAACAGT
 GCTGAATATCTACAGGGGAATCATCAACCTCCTGCAGCTGAATGTAAAGAAGACACAGAATGTCTATGAGATGCAAGAGTC
 TGGAGCTCATGGTGTGTGCAAGACCAACTATGTTCATTAGGGAGGACGCGAGGGCCGAACGCATTCATCTGACCATGACCAA
 GGACCTGAACCACTGCCA

2) Definição: *Oreochromis aureus* vitellogenin Precursor (Vtg1) mRNA,
 Complete cds.

Título: Cloning of Full-Length *Oreochromis aureus* Vitellogenin cDNA and
 its Deduced Primary Structure.

Autor: Lim,E.H., Lam,T.J. & Ding,J.L.

Sequência de nucleotídeos:

1	acatccacca	gccatgaggg	tgcttgtact	agctcttgc	gtggctctcg	cagtggggga
61	ccagtccaac	ttggccccag	gattcgccctc	tgtaagacc	tacatgtaca	aatatgaagc
121	ggttcttatg	ggcggcctgc	ctgaagaggg	cctggctcga	gctgggggta	aatccgggg
181	caaagttttg	atcagtgcaa	caagtgccaa	cgactacatt	ctgaagcttg	tagaccctca
241	gttgctggag	tacagtggca	tctggcccaa	agatcctttc	catccagcca	ccaagctcac
301	cacagccctg	gctactcagc	tctcgacacc	gatcaagttt	gagtatacaa	acggcgttgt
361	cgggagactg	gctgcacctc	ctggggctctc	cacaacagtg	ctgaatatct	acaggggaat
421	catcaacctc	ctgcagctga	atgtaaagaa	gacacagaac	gtctacgaga	tgcaagagtc
481	tggagctcat	ggtgtgtgca	agaccaacta	tgtgatcagg	gaggacgcga	gagccgaacg
541	cattcatctg	accaagacca	aggacctgaa	ccactgccag	gagaaaatca	tgaaggccat
601	cggcttgaa	cacgtagaga	aatgccatga	ttgtgaagct	agaggaaaga	gctgaaggg
661	aactgcttcc	tataactaca	tcatgaagcc	agcaccagct	ggttctctga	ttatggaggc
721	tgctgctaga	gaggtcatcg	aattctcacc	tttcaacatt	ttgaatggcg	ctgctcagat
781	ggagtctaag	caaattctga	ccttcctgga	tatcgagaac	accctgtgg	atcatgccag
841	atacacctat	gttcaccgcg	gatccctgca	gtatgagcat	ggcagcgaga	ttctccagac
901	acccatccat	cttctgaggg	tcacccatgc	cgaggctcag	attgtcagca	ctctgaacca
961	cctggtagcc	tccaacgtgg	ccaaggtcca	tgaagatgcc	cctctgaagt	ttgttgagct
1021	catccaggtg	atgctgtgtg	ccagatttga	gactattgag	tccctctggg	ctcagtttaa
1081	atctagacct	gatcacaggt	actggttact	gaatgctgtc	ccccacattc	gcactcacgc
1141	tgcgcttaag	ttcctcattg	agaagctcct	tgctaagtga	ttaagtgaga	ctgaagctgc
1201	tatggctctc	ttggaatgtc	tgcactctgt	gacagctgac	cagaaaacca	ttgaacttgt
1261	cagaagcctg	gctgagaacc	acagagtgaa	acgtaacgct	gtgctcaacg	agattgtgat
1321	gctgggctgg	ggcactgtaa	tttccaggtt	ctgtaaagcg	cagccatctt	gctcatctga
1381	tcttgtgaca	cctgtacata	gacaagttgc	agaggctgtt	gaaactgggt	acatcgatca
1441	gctcactgtc	acgctcaaat	gcctggataa	cgctggacat	cctgctagca	ttaagacaat
1501	catgaagttc	ctgcctggct	ttggcagctg	tgctgcccca	gtcccactca	aagttcaggt
1561	tgacgctggt	ctagccctga	ggagaattgc	aaagagggaa	cccaagatgg	tccaggaaat
1621	agcttctcag	ttgctcatgg	aaaagcatct	ccatgcagaa	ctgctgatgg	ttgctgccat
1681	ggtgctcttt	gagactaaac	tcccctgggg	tctagcagct	agcatttcca	cagccttgat
1741	caaagaaaag	aacctgcagg	tcgttagctt	tgtctactct	tacatgaagg	ccatggccaa
1801	gaccacatcc	cctgaccacg	tttctgtttg	tcgagcatgt	aatgttgcc	tgaggttcct
1861	caaccccaaa	ttaggcagac	tgaacttccg	ctacagccga	gccttccatg	tggtaccta
1921	taacaatgcc	tggatgatgg	gtgctgccc	cagtgccctc	ttaattaacg	acgctgcaac
1981	cgtgttacc	agaatgatta	tgcccaaagc	ccgtacttac	atggccggag	cttatgttga
2041	tgcttttgag	gttggagtga	ggactgaggg	aatccaggag	gctcttttga	aaagacgaca
2101	tgaaaattct	gagaatgcag	acaggatcac	caagattaaa	caagccatga	gagctctttc
2161	tgagtggagg	gctaattcctt	cgagccaggg	cctggcctct	atgtatgtga	aggtcttcgg
2221	acaagaaatt	gcatttgcca	acattgacaa	atccaaggtt	gaccagctta	tccagtttgc
2281	cagtggacct	ttgagaaacg	tattcagaga	tgctgtgaa	tctgtgctgt	ctggttatgc
2341	aacacatttt	gctaaaccaa	tgctgctcgg	tgagctccgt	ctcactcttc	ccaccactgt
2401	tgggttgccc	atggagatca	gcctcattac	atccgctgtg	actgctgcac	ctggtgacgt
2461	ccaagccact	gtgtcaccac	ctctgcctgt	caactaccga	gtttcccagc	ttctggagct

```

2521 cgatatccaa ctgagggcta cagttgctcc aagtcttgcc atgcagacct atgcattcat
2581 ggggtgtgaac accgccttaa tccaggctgc agtgatgaca aaagccaaag tttacacagc
2641 tgttcctgca cagataaaag caaggattga cattgttaag ggcaacttga aggttgagtt
2701 cctgtctctc cagggcatta acacaattgc atctgcacat gcggagacgg ttgccattgc
2761 aagaaatgtg gaagacctcc cagccgcaag aagcacacca ctgatctcat ctgaaactgc
2821 atcacaactt tcaaaggcct ctctcaactc aaagatctcc aggatggcat cctctgtgac
2881 tgggtgcatg tctgctcat ctgaaatcat tcctgctgac ctgccaaagta agattgggag
2941 gaaaatgaaa ctccctaaaa cctacaggaa gaaaatccgt gcttcaagca gaatgctagg
3001 attcaaggcc tacgctgaga ttgaatctca caatgccgcc tacatcagag actgccctct
3061 ctacgctctg atcggaaagc atgctgcttc tgttaggatt gctccagctt ctggaccagt
3121 cattgagaag attgaagttg agattcaggt cggagataaa gcagcagaaa atatgattaa
3181 agcgattgac atgagcgaag aggaggaagc tcttgaggat aagaatgtcc tcttggaaaat
3241 caagataaaa ctggcactg gtctcaagaa caccacatca tcttctcca gtcctccag
3301 ctccctctca tccagctctc gctccaacaa gtcttcttca tccagttccc gtcctccag
3361 ctcccagtca tccagctctc gttcccatag gtctcgtctc agaaagtccc agtctagcag
3421 ctctcagtca agccgctctc cctcaagctc ttctctctct tctctctctt catcatccag
3481 atcttctctc aggtcatctt ccagatcatc ttccagatct tcttctaggt cctcctctcg
3541 ctccagaact aagatggctg acattgttgc tcctattatc acgacgtcca ccagagtgag
3601 cagttcctcc agtctgacag cctctaacag ctctccagc agtgcttcat acttgctcag
3661 ctcatctaaa agaagaagca gaagcagaag cagcagcagc agtagcagca gcagcagcag
3721 cagcagcagt agcagcagca gcagcagcag cagtagcaag aacagcaagc gcagcaagag
3781 cagcaacagc aagtcatcaa gctctaggtc ctctcggcgc agtgctcagt ctaagcaaca
3841 actgcttgcc ttgaagtcca gaaagaacca cgtccacagg catgccatct ccacacagcg
3901 cggcagcagt cacagcagtg cccgcagctt cgattccatc tacaataagg ccaagtacct
3961 cgctaacaca ctactcctg ccatgtccat tgcaatccgt gccgtgagag tcgaccacaa
4021 ggtccaggga taccagctag cagcttacct ggacaaacag accaatagac tgcagttgat
4081 ttttgccaga gtcgctgaga aggacaactg gagaatctgt gccgacattg tgcagctgag
4141 ttgcacaaag ctgatggcca agactgcctg ggggtgctgaa tgcaagcaat actccaccat
4201 gattgtagct gaaactggtc ttttgggtca tgagcccgca gcccgcttga agctgacctg
4261 ggacaaactg ccaggaagca taaagcacta cgcaaagagg gcgttgaat ccatgtccc
4321 tattgtcaa gaatatggag taaactacgc aaaggccaag aatcctcgta atcaaatcaa
4381 actgactgta gctgttgcta ctgagacaag catgaatatt gtgtgaaca caccaaaggc
4441 aatcgtttac aagcgtgggg tgtgtctacc tgttgcttta ccaattggaa acactgctgc
4501 cgagctgcaa gcgaccggg acaactgggc tgacaagatg tcctatttgg ttaccaaaagc
4561 taacgcagtt gaatgctccc tcatcaacaa cactgacc acattcaaca acaggaagc
4621 tagagatgag ctgccacact cgtgctacca ggtcttggct caggattgca caccagaact
4681 caaattcatg gttctgctga agaaagacca aatacaggat cagaaccaga tcaatgttaa
4741 gatttcagac atcgatgtgg acatgtatcg gaagaacaac gccattgagg tgatggttaa
4801 cggagttgaa atccctaaca gcaacctgcc atacctgat ccatacagta acatacatat
4861 aagacagtca aatgaaggca ttactctcaa tgcaccagc catggtcttc aggaggtctt
4921 ccttggcttc aacgagctga gggttaaagt tgcagactgg atgaaaggaa agacttgtgg
4981 tgcctgtgga acggcaagcg gaaatgtcgg agacgagtac cgcacacca gtgaacaggt
5041 gaccaaggat gccatcagct acgccaactc ctgggttctg tcttcaaca cctgccgtga
5101 tccctccgag tgttccatca agcaggaatc tegtgaagctg gagaagcggg tgatcttga
5161 aggtgtggag tccaaatgct actctgttga gcccgctgct cagtgcctgc ccgctgtat
5221 cccagtgaga accactaccg tcaacgttgg ctttactgc ctgccagtg acacaactgt
5281 ggaccgttct ggtctgagca gcttcttga gaagagcatc gacctgagg atactgcaga
5341 agcccactg gctgtcgtc gcaactctca gtgtgcttaa tctcattgcc ttcggtcaca
5401 tgacattttg ttttctgtt taggcagtg ttgttaatta gcttggctc aacttgtaaa
5461 cttaataaaa ttggaaaagc atgtgaagca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a

```

A partir destes dados iniciou-se o design dos primers (oligonucleotídeos iniciadores). Como foram encontradas duas seqüências do gênero *Oreochromis*, onde o grau de homologia é razoável (proximidade filogenética), optou-se pelo design de primers específicos em vez de degenerados, pois os primeiros possuem melhores chances de amplificar o gene de interesse. Utilizando-se o software CLUSTAL W foi traçado o alinhamento das seqüências, obtendo-se a resposta seguinte:

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

```

Oreochromis      TCGAGCTGGGGTTAAAATCCGGGGCAAAGTTTTGATCAGTGCAACAAGTGCCAACGACTA 60
O aureus         TCGAGCTGGGGTTAAAATCCGGGGCAAAGTTTTGATCAGTGCAACAAGTGCCAACGACTA 60
*****

Oreochromis      CATTCTGAAGCTTGTAGACCCTCAGTTGCTGGAGTACAGTGGCATCTGGCCCAAAGATCC 120
O                CATTCTGAAGCTTGTAGACCCTCAGTTGCTGGAGTACAGTGGCATCTGGCCCAAAGATCC 120
*****

Oreochromis      TTTCCATCCAGCCACCAAGCTCACCACCTGCCCTGGCTACTCAGCTCTCGACACCGATCAA 180
O                TTTCCATCCAGCCACCAAGCTCACCACAGCCCTGGCTACTCAGCTCTCGACACCGATCAA 180
*****

Oreochromis      GTTTGAGTATACAAACGGCGTTGTGTTGGGAGACTGGCTGCACCTCTGGGGTCTCCACAAC 240
O                GTTTGAGTATACAAACGGCGTTGTGTTGGGAGACTGGCTGCACCTCTGGGGTCTCCACAAC 240
*****

Oreochromis      AGTGCTGAATATCTACAGGGGAATCATCAACCTCCTGCAGCTGAATGTAAAGAAGACACA 300
O                AGTGCTGAATATCTACAGGGGAATCATCAACCTCCTGCAGCTGAATGTAAAGAAGACACA 300
*****

Oreochromis      GAATGTCTATGAGATGCAAGAGTCTGGAGTCATGGTGTGTGCAAGACCAACTATGTGAT 360
O                GAACGTCTACGAGATGCAAGAGTCTGGAGTCATGGTGTGTGCAAGACCAACTATGTGAT 360
*** **

Oreochromis      TAGGGAGGACGCGAGGGCCGAACGCATTTCATCTGACCATGACCAAGGACCTGAACCACTG 420
O                CAGGGAGGACGCGAGAGCCGAACGCATTTCATCTGACCAAGGACCTGAACCACTG 420
*****

Oreochromis      CCA 423
O                CCA 423
***

```

Tendo a seqüência alinhada, utilizou-se novamente o software para identificação de semelhanças que possibilitaram a determinação de primers específicos (Quadro 1), que foram sintetizados na menor escala possível.

Quadro 1. Primers selecionados para aplicação em RT-PCR

VTG-For 5'TCGAGCTGGGGTTAAAATCC

VTG-Rev 5'CTGCAGGAGGTTGATGATTC

Com os primers sintetizados, que irão delimitar o segmento a ser amplificado, foi possível iniciar os estudos de RT-PCR. A RT-PCR é um dos métodos mais comumente utilizados para mensurar os níveis de RNA mensageiro em amostras biológicas. Com esta técnica são feitas cópias de DNA "in vitro", usando os elementos básicos do processo de replicação do DNA, porém o processo inicia-se a partir do mRNA (transcrição reversa) que

primeiro irá originar uma fita de DNA complementar (cDNA) para que a enzima DNA polimerase possa atuar. A Figura 21 ilustra de modo simplificado a técnica.

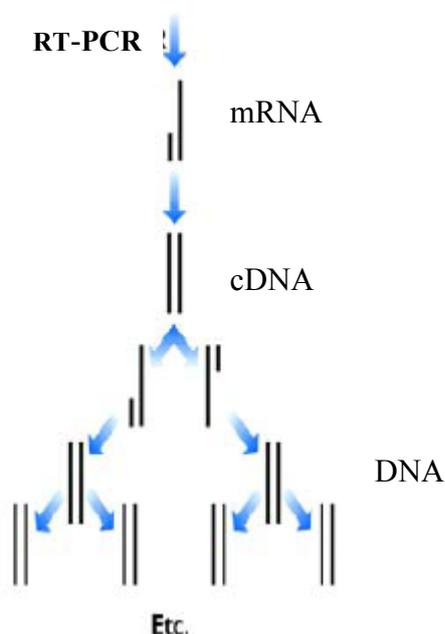


Figura 21 - Fluxograma simplificado de uma RT-PCR (Modificado de: Basics of Quantitative RT-PCR: Sample Preparation and Amplification Techniques. Disponível em: www.ambion.com).

Para o RT-PCR padrão, tilápias fêmeas maduras (*Oreochromis niloticus*) foram selecionadas após exame de repleção gonadal. A necessidade de usar organismos nestas condições foi fundamental para o desenvolvimento da metodologia. Os organismos escolhidos foram sacrificados e tiveram os fígados imediatamente extraídos (Figura 22), fatiados e colocados em nitrogênio líquido, impedindo assim a ação de enzimas degenerativas. Sendo conservados a - 80 °C até análise.

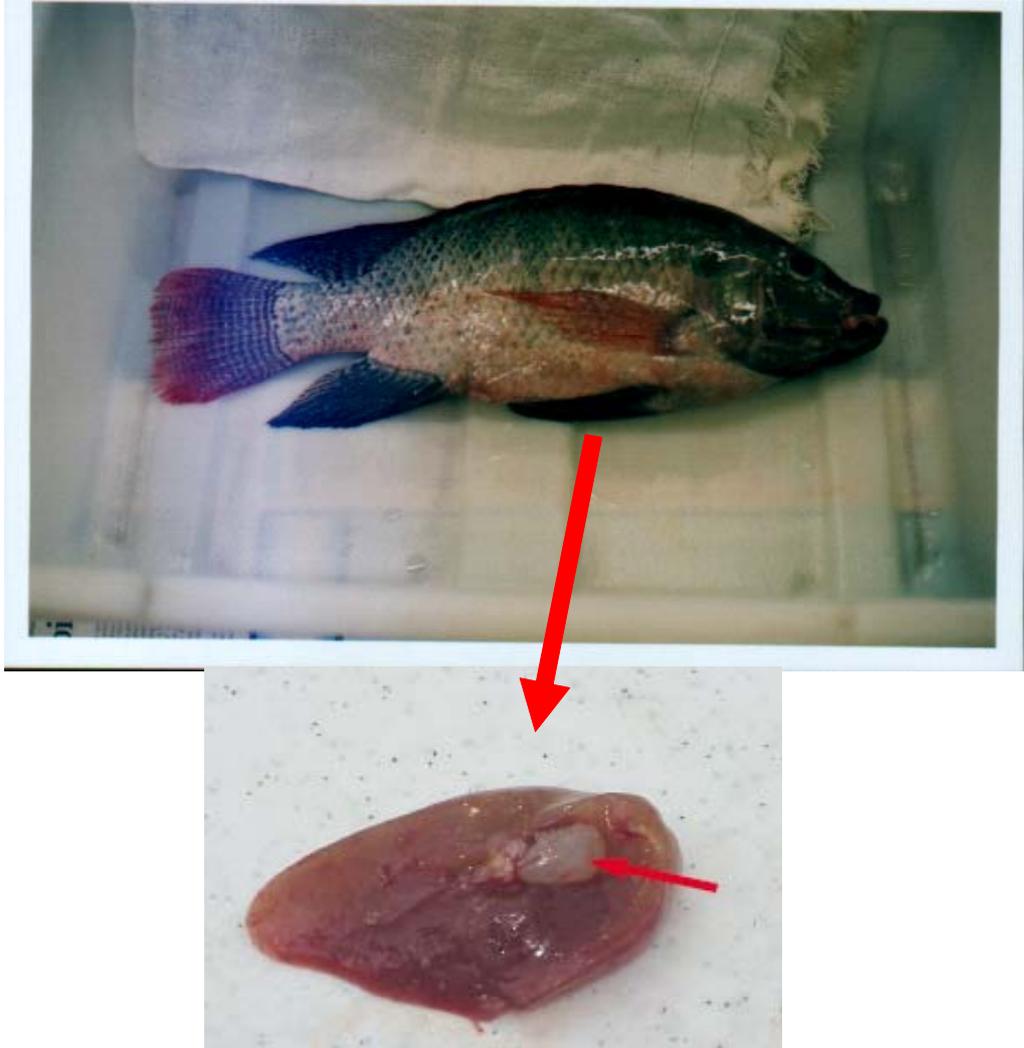


Figura 22 - Exemplo de peixe capturado no Rio do Monjolinho e do tecido alvo de estudo. Seta menor indica a vesícula biliar previamente esvaziada. Fotos fora de escala.

O tecido hepático foi então macerado sob nitrogênio líquido e 50 mg de cada amostra foi separada para extração de RNA total. Os procedimentos adotaram os passos indicados no Kit *RNAeasy Plant Mini* (QIAGEN) com pequenas modificações. O RNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro (HITACHI U-2001), medindo-se a absorvância em 260 nm ($1 \text{ D.O.}_{260\text{nm}} = 40 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$). A concentração determinada foi de $260 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

O RT-PCR foi realizado seguindo o protocolo do kit *Access RT-PCR System* (Promega). A mistura da reação foi a seguinte:

Mistura de Reação do RT-PCR	Quantidade Final
RNA total do fígado de <i>O. niloticus</i> [260 ng. L ⁻¹]	4 µL
<i>Primer Vtg</i> – For [50 pmol.µL ⁻¹]	1 µL
<i>Primer Vtg</i> - Rev [50 pmol.µL ⁻¹]	1 µL
dNTPs mix [100 mM]	1 µL
MgSO ₄ [100 mM]	2 µL
AMV/Tfl Reaction Buffer [5x]	10 µL
AMV Reverse Transcriptase [5U.µL ⁻¹]	1 µL
Tfl DNA Polymerase [5U.µL ⁻¹]	1 µL
Água livre de RNase	29 µL
Volume Final da Reação	50 µL

A reação de polimerização foi realizada em um termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.) sob as seguintes condições:

Síntese da primeira fita de cDNA

1 ciclo de 48°C por 45 min.

Síntese da segunda fita e amplificação

Desnaturação a 94°C por 2 min.

40 X { 94 °C por 30 s. (desnaturação)
55°C por 1 min. (anelamento)
72 °C por 2 min. (extensão)

Extensão final a 72 °C por 7 min.

A análise de 5 µL do produto da reação foi realizada por eletroforese horizontal em um gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio, em tampão TAE [1X], visualizado sob luz UV. O padrão utilizado foi 100 pb DNA Ladder (Gene Ruler™). Na Figura 23, uma banda correspondente a aproximadamente 300 pb pode ser visualizada representando o tamanho esperado.

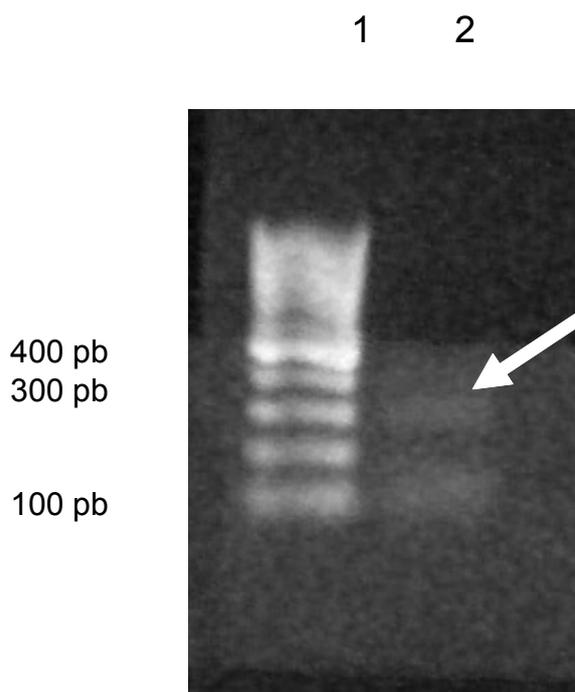


Figura 23 - Amplificação do DNA da presumível proteína Vtg de *O. niloticus* através de RT-PCR. Produto da amplificação observado em gel de agarose 0,8%, transluminado com luz ultravioleta. Linha 1: Padrão de massa molecular 100 pb DNA (Gene Ruler™); Linha 2: Banda correspondente a amplificação (~300 pb).

Para confirmar a não contaminação das amostras com DNA genômico remanescente, estas foram tratadas com DNase I (Kit Nucleo Spin) e incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Assim, todo o processo de RT-PCR foi repetido com o RNA “tratado”. A não existência de diferença entre as bandas geradas, confirmou a não interferência de DNA na amplificação da RT-PCR.

A próxima etapa consistiu na purificação do produto da RT-PCR para eliminação de algum possível resíduo advindo dos tratamentos anteriores e deixar o DNA somente em água pura, evitando assim a ocorrência de interferência nos passos posteriores. O fragmento foi purificado pelo kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), segundo o protocolo do fabricante.

O próximo procedimento a ser adotado foi à ligação com o vetor de clonagem. Os vetores de clonagem são plasmídeos “manipulados”, ou seja, originalmente são pequenas moléculas de DNA circular que foram “abertas” para receber produtos de PCR e então se “circularizar” de novo através de

reações específicas. Porém antes de se iniciar a ligação, é essencial a adição de dATPs ao fragmento purificado para restituir as aberturas 3'A necessárias para a ação do vetor. Os componentes envolvidos na reação de adição são mostrados abaixo:

Reação de Adição de dATPs	Quantidade Final
Fragmento Purificado	7 μL
Tampão da Taq Gen I* [10x]	1 μL
MgCl ₂ [50 mM]	0,5 μL
dATPs [10 mM]	0,2 μL
Taq Gen I [5U. μL^{-1}]	0,2 μL
Água MilliQ	1,1 μL
Volume Final	10 μL

* Taq Gen I é a DNA polimerase da Invitrogen™ life technologies.

Após incubação a 70 °C por 30 minutos, o fragmento está pronto para ser ligado ao vetor de clonagem pCR®II-TOPO [Invitrogen (Figura 24)]. A reação da mistura de ligação entre vetor e fragmento seguiu o protocolo TOPO TA Cloning® (Invitrogen), e foi a seguinte:

Reagentes da Mistura de Ligação	Quantidade Final
Fragmento da PCR adicionado de dATPs	4 μL
Vetor TOPO [10 ng. μL^{-1}]	1 μL
Salt Solution (Kit) [10 mM]	1 μL
Volume Final	6 μL

cultura foi então plaqueada em meio sólido Lúria-Bertani (LB) contendo X-gal (30 µL) (Gibco BRL), IPTG (25 µL) (Sigma) e Ampicilina (7,5 µL) (Sigma), e mantida em estufa a 37 °C overnight, a fim de verificar o crescimento de colônias positivas brancas (plasmídeo com inserto) e de colônias negativas azuis.

O procedimento seguinte consistiu em pinçar colônias brancas e azuis (controle negativo) e fazer a transferência para um pré-inócuo (5 ml de LB + antibiótico Kanamicina), mantido a 37 °C overnight em mesa agitadora. Deste inócuo, 3 mL foram então utilizados para executar a extração do DNA plasmidial através do Kit Wizard[®] Plus SV Minipreps (Promega). Após a seqüência de passos do protocolo, foi preparado um gel de agarose onde os plasmídeos foram quantificados pela comparação com padrões específicos; a quantidade determinada foi de 150 ng.µL⁻¹.

Após o cumprimento de todo o trabalho laboratorial acima detalhado, foi confirmada a propagação do plasmídeo através da clonagem. Como os clones continham o DNA de interesse, a amostra foi finalmente submetida para seqüenciamento automático realizado num seqüenciador ABI Prism 377 (Perkin Elmer). Caso o seqüenciamento confirme a seqüência nucleotídica da Vtg encontrada inicialmente nas pesquisas efetuadas para as outras espécies de tilápia, teremos a certeza de que a mensagem do RNA isolado para *O. niloticus* e submetido a RT-PCR seria a de expressar a proteína Vtg e teremos assim conseguido um meio de determinar um biomarcador para a espécie encontrada em maior abundância, nestes estudos, no Rio do Monjolinho.

OBS: Entre o desenvolvimento dos protocolos acima citados, as amostras eram mantidas congeladas a – 80°C.

3.4.4 – Índice Hepato-Somático (HSI)

Em adição aos estudos com a Vtg, o HSI foi calculado de acordo com a equação originalmente apresentada por HTUN-HAN, 1978:

$$\text{HSI} = \text{Peso do fígado} / \text{Peso do corpo (sem a víscera)} \times 100$$

3.5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 - Eletroforese

Dentre o plasma dos 19 exemplares machos coletados no Rio do Monjolinho e avaliados nas análises de eletroforese 89,5% (17 indivíduos) acusaram a presença de bandas protéicas adicionais com massa molecular próximas a 140 KDa semelhantes à proteína Vtg, sendo estas inexistentes nos exemplares da área referência. As Figuras seguintes (25, 26 e 27) ilustram a separação das proteínas plasmáticas em três dos géis executados.

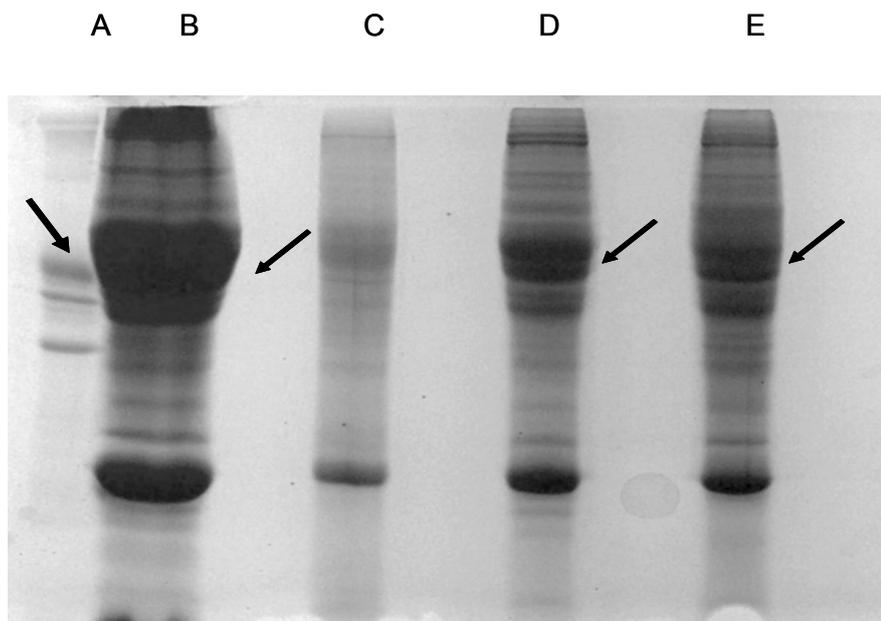


Figura 25 - Exemplo de um dos géis obtidos nos ensaios de eletroforese para *Geophagus brasiliensis*. Linha A: marcador de massa molecular de 200 KDa (β -amilase), de 150 KDa (álcool desidrogenase) e de 116 KDa (β -galactosidase); Linha B: Fêmea (controle interno +); Linha C: Macho de local não poluído (controle externo -); Linha D e E: Machos (biomarcadores de exposição). Setas indicam a presumível proteína Vtg.

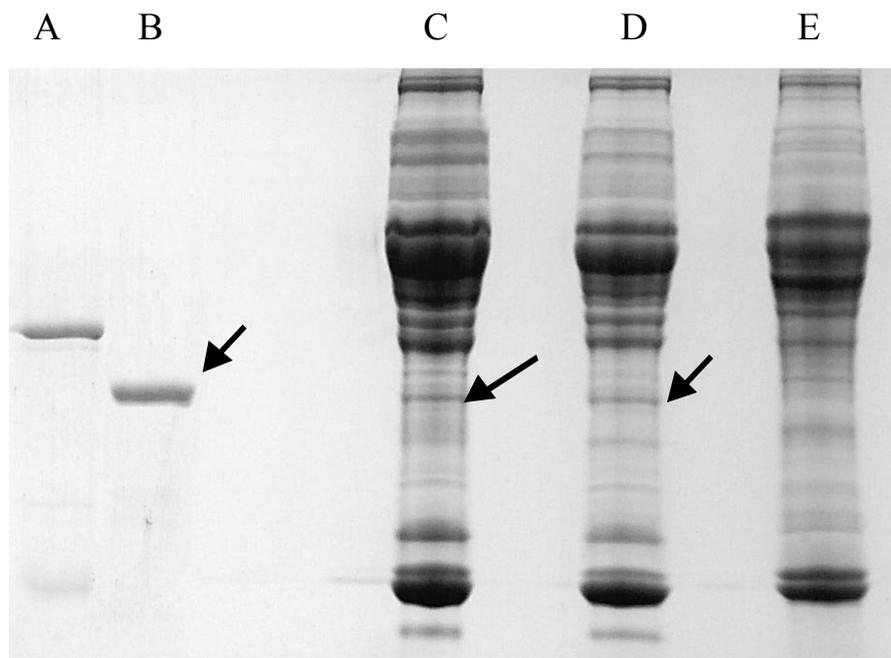


Figura 26 - Exemplo de um dos géis obtidos nos ensaios de eletroforese para *Oreochromis niloticus*. Linha A: marcador de 200 KDa; Linha B: marcador de 150 KDa; Linha C: Fêmea (controle interno +); Linha D: (biomarcador de exposição); Linha E: Macho (controle externo -). Setas indicam a presumível proteína Vtg.

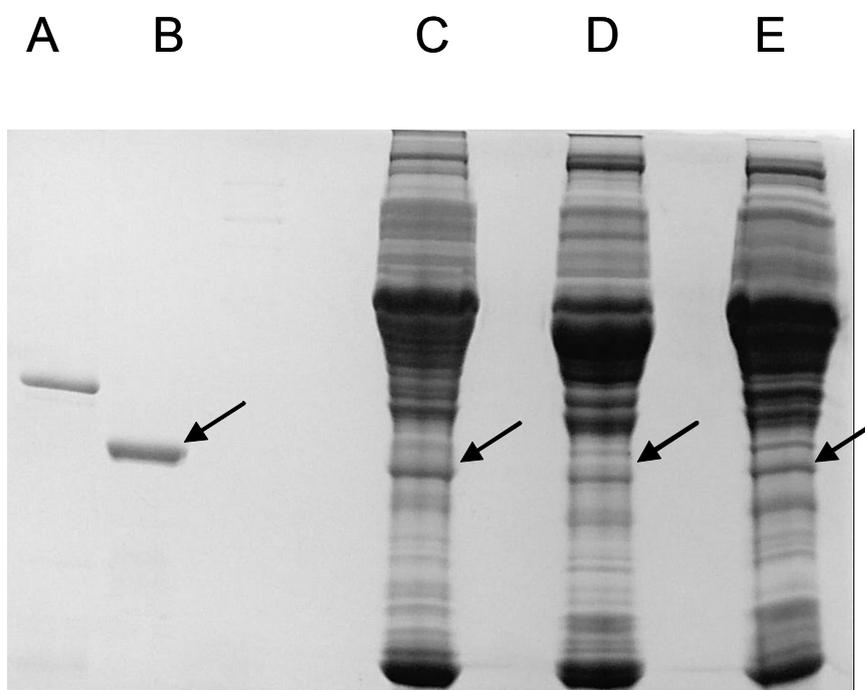


Figura 27 - Exemplo de um dos géis obtidos nos ensaios de eletroforese para *Oreochromis niloticus*. Linha A: marcador de 200 KDa; Linha B: marcador de 150 KDa; Linhas C, D e E: Machos do Rio do Monjolinho (biomarcador de exposição). Setas indicam a presumível proteína Vtg.

Estes resultados estão de acordo com massas moleculares conhecidos para a Vtg de vários ciclídeos (variando entre 120 e 220 KDa), incluindo *O. niloticus* (KIM & TAKEMURA, 2002; NDIAYE et al. 2006). Portanto o aparecimento destas bandas protéicas nos peixes capturados no Rio do Monjolinho em contraste com a ausência nos peixes da área controle, denota forte evidência de desregulação endócrina. Este método para detecção indireta para a presumível Vtg foi aplicado com sucesso por ALLNER et al., 1999 em sete espécies de peixes encontrados em rios alemães. Ele possui a vantagem desde que haja uma área referência de alta confiabilidade para peixes controle, de não necessitar de padrões específicos, os quais são inexistentes, para a maioria das espécies e de ser realizado através de técnicas relativamente simples de eletroforese. Sendo assim, ideal para uma sondagem de varredura inicial em ambientes suspeitos de contaminação por compostos estrogênicos, principalmente pelas respostas serem mutuamente excludentes (presença/ausência de bandas protéicas). Porém para assegurar com confiabilidade adequada se tratar de um efeito desregulador endócrino há de se buscar a especificidade utilizando-se biomarcadores.

3.5.2 – RT-PCR

A metodologia desenvolvida para a determinação da expressão do RNA mensageiro da vitelogenina (Vtg mRNA) para a tilápia *Oreochromis niloticus* foi confirmada pelo seqüenciamento, sendo o fragmento de DNA amplificado 100% idêntico as seqüências depositadas nos bancos de genes. Este resultado alcançado é de grande valia, pois possibilita resposta específica frente à poluição por compostos estrogênicos, podendo então ser empregado em estudos de biomonitoramento prospectivos (“caged fish”) e reativos (verificação do grau de perturbação imposto ao ambiente). Possuindo ainda a vantagem de utilizar uma espécie de valor econômico e amplamente distribuída em rios e lagos brasileiros.

A síntese do Vtg mRNA no fígado de peixes machos é o primeiro efeito desencadeado pelos estrógenos, precedendo a translação da proteína vitelogenina (Vtg) e sua posterior secreção na corrente sanguínea (GARCÍA-REYERO et al. 2004). Portanto permite um aumento potencial na sensibilidade da detecção de distúrbios impostos aos organismos.

O quadro 2 mostra os primers para Vtg já anteriormente selecionados para RT-PCR, mas também os utilizados como controle interno da amplificação para assegurar que o RNA não foi degradado. A gliceroaldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e a subunidade ribossomal (18S), foram escolhidas por serem homólogas entre os vertebrados e usualmente usadas em estudos com teleósteos (D’COTTA et al., 2001; RODGERS et al., 2003).

Quadro 2. Primers* selecionados para aplicação na RT-PCR de *O. niloticus*

		<i>Tamanho do Amplificado</i>
VTG-For	5'TCGAGCTGGGGTTAAAATCC	
VTG-Rev	5'CTGCAGGAGGTTGATGATTC	
		~300 pb
18S-For	5'AGGGTTCGATTCCGGAGA	
18S-Rev	5'AGGGCATCACAGACCTG	
		1085 pb
GAPDH-For	5'TCTGTCTTCCAGTGTATGAAGC	
GAPDH-Rev	5'ATGCCATGCCTGTCAGCTTACC	
		456 pb

* Escala de síntese 25 nmole.

Dos 12 peixes machos capturados na última coleta no Rio do Monjolinho, nove apresentaram a confirmação da amplificação da seqüência nucleotídica da Vtg por RT-PCR. As figuras 28 e 29 exemplificam géis obtidos na análise. Este fato indica a presença de substâncias desreguladoras endócrinas nas águas do rio com alta capacidade de causar efeitos adversos nas espécies aquáticas. Estes impactos podem ser de forma direta através de danos a fisiologia reprodutiva e/ou indireta através das conseqüências do stress a que os organismos são submetidos (e.g. deficiência imunológica).

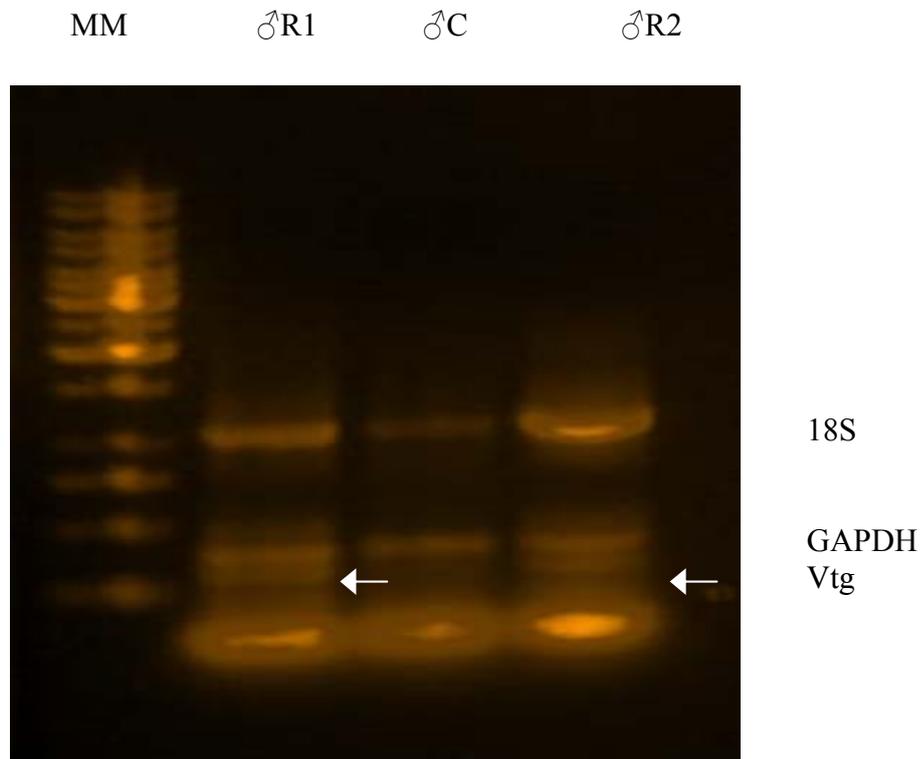


Figura 28 - Produto de amplificação em gel de agarose 0,8%, transluminado com luz ultravioleta. Linha 1: Padrão de massa molecular (Gene Ruler™); Linha 2: Macho de *Oreochromis niloticus* do Rio do Monjolinho; Linha 3: Macho de *O. niloticus* de área controle; Linha 4: Macho de *O. niloticus* do Rio do Monjolinho. Setas indicam o fragmento amplificado da vitelogenina.

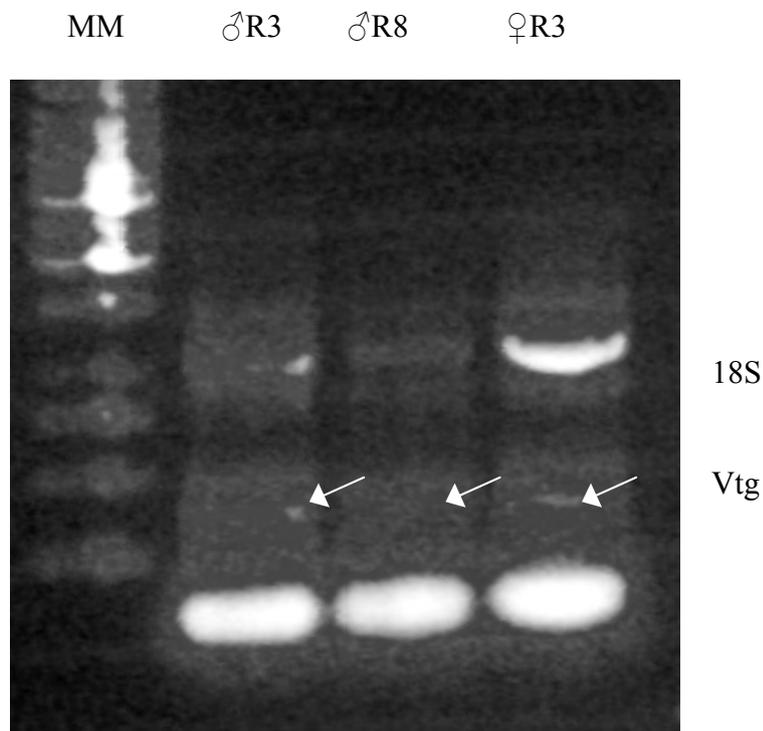


Figura 29 - Produto de amplificação em gel de agarose 0,8%, transluminado com luz ultravioleta (negativo). Linha 1: Padrão de massa molecular (Gene Ruler™); Linha 2: Macho de *Oreochromis niloticus* do Rio do Monjolinho; Linha 3: Macho de *O. niloticus* do Rio do Monjolinho; Linha 4: Fêmea de *O. niloticus* do Rio do Monjolinho. Setas indicam o fragmento amplificado da vitelogenina.

Já faz alguns anos que mensageiros do RNA têm recebido atenção para estudos de contaminação ambiental, sendo instituído como um teste molecular confirmatório da presença de DE (BOWMAN & DENSLOW, 1999). Este tipo de biomarcador é específico para cada gene e espécie de peixe (dependendo da conservação do gene entre as espécies) e foi qualificado como uma poderosa ferramenta em estudos ecotoxicológicos (BRADLEY & THEODORAKIS, 2002) aplicado por vários pesquisadores ao redor do mundo para detecção de alterações desencadeadas por compostos estrogênicos (HUTCHINSON et al., 2006).

Um ponto que deve ser frisado na utilização desta metodologia é a labilidade do RNA, o qual rapidamente começa a degradar após a morte do animal. Sendo ainda, que as RNases são praticamente ubíquas estando presentes em particulados, vidrarias, reagentes, mãos, saliva, etc.. Assim deve-se sempre utilizar material estéril RNase free e executar os procedimentos em local e com equipamentos (luva, máscaras) apropriados. Tomando-se estas precauções, o método se mostra bastante adequado na determinação da exposição/efeitos de peixes à ED, pois requer pequenas quantidades de amostras de fígado (sempre mantidas em nitrogênio líquido) e é executável através de técnicas estabelecidas em biologia molecular.

3.5.2 – HSI

Estudos demonstram que peixes de locais contaminados têm HSI mais elevados quando comparados a peixes de locais relativamente sem contaminação (YANG & BAUMANN, 2006).

A Tabela 5 mostra alguns indicadores morfométricos e os índices hepato-somáticos calculados para exemplares de *O. niloticus* provenientes da amostragem direcionada para estudos em RT-PCR (Fevereiro/2006). As médias para os valores do rio e do controle foram $2,00 \pm 0,16$ e $1,67 \pm 0,03$ respectivamente. A aplicação do teste-t de Bonferroni ($P < 0,05$) indicou diferença significativa entre os dois grupos. Conquanto o número de exemplares amostrados não possa ser considerado representativo para toda a população existente no ambiente, a pré-seleção em campo quanto ao tamanho (médias de 26,3 cm e 23,6 cm para o rio e área controle respectivamente) permitem visualizar uma diferença de condição entre os organismos de cada

localidade. Considerando ainda os HSI para amostras obtidas anteriormente (Janeiro de 2005), temos para o Rio do Monjolinho $1,99 \pm 0,18$ e para a área controle $1,65 \pm 0,13$, estes valores parecem enfatizar a existência de um padrão, ou seja, um estado de saúde inferior para os peixes que habitam (transitam) o rio.

Tabela 5 – Dados morfométricos para *Oreochromis niloticus* capturadas no Rio do Monjolinho e na Estação Controle

Sexo	Peso (g)	Comprimento Total (cm)	Peso do Fígado (g)	HSI %	Observação
M	337,00	25,30	6,30	1,91	
M	198,35	21,54	4,37	2,25	*
M	331,45	26,54	6,10	1,87	
M	403,04	28,10	7,96	2,01	
M	252,41	24,23	5,88	2,39	*
M	236,55	24,81	4,71	2,03	
M	596,13	30,00	11,45	1,96	
M	244,00	23,50	5,00	2,09	*
M	231,00	25,60	4,68	2,07	
M	183,20	19,50	3,45	1,92	*
M	687,10	31,70	12,59	1,87	
M	459,00	28,81	7,99	1,77	
F	851,35	37,50	17,68	2,12	*
F	333,00	28,64	6,18	1,89	
F	182,14	20,00	3,39	1,90	
F	189,12	20,11	3,16	1,70	
M	275,29	24,30	4,43	1,64	
F	172,12	21,22	2,90	1,71	
M	314,71	27,24	5,23	1,69	
M	288,10	25,30	4,68	1,65	

Dados em azul referentes à área controle

* Exemplos marcados com asterisco apresentaram fígado com coloração desbotada (do inglês: tan or “coffee with cream”)

A verificação da relação entre ED e HSI é importante, pois de acordo com MUKHERJEE et al., 1991 o aumento do HSI devido à exposição a poluentes pode provocar disfunção hepática capaz de interferir com o desenvolvimento normal e outros processos reprodutivos. Sendo justamente os processos reprodutivos principalmente afetados pelas substâncias estrogênicas.

Embora o aumento do HSI possa ser relacionado à exposição a estrógenos (HUANG et al., 2003; KORSGAARD, 2005), substâncias como metais (MARTÍN-DIAZI et al., 2005), hidrocarbonetos aromáticos (PINKEY, 2001) e microcistinas (BURY, 1997) dentre outras, também podem provocar o

aumento deste índice. Portanto os estrógenos em relação aos HSI para o Rio do Monjolinho atuam como um cofator para elevação deste parâmetro merístico.

3.5 – REFERÊNCIAS

Allner, B., Wegener, G., Knacker, T., Stahlschmidt-Allner, P. 1999. Electrophoretic determination of estrogen-induced protein in fish exposed to synthetic and naturally occurring chemicals. *Sci. Total Environ.*, 233: 21-31.

ASIH, AFS, AIFRB. 1988. Guidelines for use of fishes in field research. *Fisheries*, 13 (2): 16-23.

ARUKWE, A. 2001. Cellular and molecular responses to endocrine-modulators and the impact on fish reproduction. *Marine Pollution Bulletin*, 42(8): 643-655.

BOWMAN, C.J. & DENSLOW, N.D. 1999. Development and validation of a species-and gene-specific molecular biomarker: Vitellogenin mRNA in largemouth bass (*Micropterus salmonides*). *Ecotoxicology*, 8: 399-416.

BRADLEY, B. & THEODORAKIS, C. 2002. The post-genomic era and ecotoxicology (Editorial). *Ecotoxicology*, 11: 7-9.

BRAMMER, S.P.A. 2001. Técnica de Eletroforese: Importância e Aplicações em Análises Genéticas. Embrapa Trigo. 13 p.

BROWDER, J.A. 1988. Introduction: Aquatic organisms as indicators of environmental pollution. *Water Resources Bulletin*, 24: 927-929.

BURY, N.R., McGEER, J.C., EDDY, F.B., CODD, G.A. 1997. Liver damage in brown trout, *Salmo trutta* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following administration of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR via the dorsal aorta. *Journal of Fish Diseases*, 20: 209-215.

CAIRNS Jr., J. 2003. Eco-Ethics and Sustainability Ethics. Inter-Research. 154p. Disponível em: <http://www.esep.de>, acessada em Julho de 2004.

CCAC. 2005. Guidelines on: The Care and Use of Fishes in Research, Teaching and Testing. Informações em: <http://www.ccac.ca>, acessada em Janeiro de 2005.

CHANDROO, K.P., YUE, S., MOCCIA, R.D. 2004. An evaluation of current perspectives on consciousness and pain in fishes. *Fish and Fisheries*, 5: 281-295.

DA SILVA JUNIOR, J.D. 2001. Eletroforese de Proteínas: Guia Teórico e Prático. Editora Interciência, 125p.

D'COTTA, H., FOSTIER, A., GUIGUEN, Y., GOVOROUN, M., BAROILLER, J.F. 2001. Search for genes involved in the temperature-induced gonadal sex differentiation in the tilapia *Oreochromis niloticus*. J. Esp. Zool., 290(6): 574-585.

GARCÍA-REYERO, N., RALDÚA, D., QUIRÓS, L., LLAVERIA, G., CERDÀ, J., BARCELÓ, D., GRIMALT, J.O., PIÑA, B. 2004. Use of vitellogenin mRNA biomarker for endocrine disruption in feral and cultured fish. Anal. Bioanal. Chem., 378: 670-675.

HTUN-HAN, M. 1978. The reproductive biology of the dab *Limanda limanda* (L.) in the North Sea: Gonadosomatic index, hepatosomatic index and conditions factor. J. Fish Biol., 13: 369-375.

HUANG, Y-W., TWIDWELL, D.L., ELROD, J.C. 2003. Occurrence and effects of endocrine disrupting chemicals in the environment. Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management, 7 (4): 241-252.

HUTCHINSON, T.H., ANKLEY, G.T., HELMUT, S., TYLER, C.R. 2006. Screening and testing for endocrine disruption in fish – biomarkers as “signposts,” not “traffic lights,” in risk assessment. Environ. Health Perspect., 114: 106-114.

ISHIBASHI, H., KATSUYASU, T., MUTSUYOSI, T., ISHIBASHI, Y., NAGAE, M., KOHRA, S., TAKAO, Y., TOMINAGA, N., ARIZONO, K. 2001. *In vivo* testing system for determining the estrogenic activity of endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in goldfish (*Carassius auratus*). Journal of Health Science, 47(2): 213-218.

JAGOE, C.H & NEWMAN, M. 1996. Ecotoxicology a Hierarchical Treatment. CRC Press. 411p.

KIM, B.H. & TAKEMURA, A. 2002. *In vitro* vitellogenin synthesis in primary cultures of tilapia hepatocytes. Fisheries Science, 68: 123-131.

KITCHELL, R.L. & JHONSON, R.D. 1985. Assessment of pain in animals. In: MOBERG, G.P. ed. Animal Stress. American Physiological Society. pp. 113-140.

KORSGAARD, B. 2005. Metabolic changes associated with 17 alpha-ethinylestradiol exposure in the pregnant teleost *Zoarces viviparus* (L). Electronic Journal of Ichthyology, 1: 1-20.

MARTÍN-DIAZI, M.L., TUBERTY, S.R., MCKENNEY Jr, C.L., SALESI, D., DEL VALLSI, T.A. 2005. Effects of cadmium and zinc on *Procambarus clarkii*: Simulation of the Aznalcóllar mining spill. Ciencias Mar., 31 (1B): 197-202.

MUKHERJEE, D., GUHA, D., KUMAR, V., CHAKRABARTY, S. 1991. Impairment of steroidogenesis and reproduction in sexually mature *Cyprinus carpio* by phenol and sulfide under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology*, 21 (1-2): 29-40.

NDIAYE, P., FORGUE, J., LAMOTHE, V., CAUTY, C., TACON, P., LAFON, P., DAVAIL, B., FOSTIER, A., LE MENN, F. & NUÑEZ, J. 2006. Tilapia (*Oreochromis niloticus*) vitellogenins: development of homologous and heterologous ELISAs and analysis of vitellogenin pathway through the ovarian follicle. *J. Exp. Zool.*, 305A: 576-593.

NOGA, E.J. 1996. *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*. Mosby. 367p.

PINKEY, A.E., HARSHBARGER, J.C., MAY, E.B., MELACON, M.J. 2001. Tumor prevalence and biomarkers of exposure in brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*) from the tidal Potomac River, USA, Watershed. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20:1196-1205.

RODGERS, B.D., WEBER, G.M., KELLY, K.M., LEVINE, M.A. 2003. Prolonged fasting and cortisol reduce myostatin mRNA levels in tilapia larvae; short-term fasting elevates. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 284(5): 1277-1286.

ROSE, J.D. 2002. The neurobehavioral nature of fishes and the question of awareness and pain. *Reviews in Fisheries Science*, 10: 1-38.

SCHMIDT-NIELSEN, K. 1990. *Animal Physiology: Adaptation and Environment* 4th. Cambridge University Press. 602p.

SNEDDON, L.U., BRAITHWAITE, V.A., GENTLE, M.J. 2003. Do fishes have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 270: 1115-1121.

TYLER, C.R., Van der EERDEN, B., JOBLING, S., PANTER, G., SUMPTER, J.P. 1996. Measurement of vitellogenin, a biomarker for exposure to oestrogenic chemicals, in a wide variety of cyprinid fish. *J. Comp. Physiol B*, 166: 418-426.

YANG, X. & BAUMANN, P.C. 2006. Biliary PAH metabolites and the hepatosomatic index of brown bullheads from Lake Erie tributaries. *Ecological Indicators*, 6: 567-574.

ZURLO, J., RUDACILLE, D., GOLDBERG, A.M. 1994. *Animals and Alternatives in Testing: History, Science and Ethics*. (Apêndice E). Disponível em: <http://altweb.jhsph.edu>, acessada em Março de 2005

CAPÍTULO 4:
ENSAIOS
ECOTOXICOLÓGICOS

4.1 – INTRODUÇÃO

A ecotoxicologia como ciência estruturada teve seu reconhecimento a partir do final da década de 1960 quando o toxicologista francês Dr. R. Truhaut designou por este nome a ciência que versava sobre os impactos da poluição química na qualidade ambiental (KOEMAN, 1998). Nesta época estava em curso uma mudança de arquétipos, iniciada após a Segunda Grande Guerra, com o paradigma da diluição (“a solução para a poluição é a diluição”) sendo substituído paulatinamente pelo paradigma do bumerangue (“o que você lança fora pode voltar e causar injúrias”) (NEWMAN & UNGER, 2003). Desde então a ecotoxicologia vem se desenvolvendo e incorporando diversas disciplinas em seu conteúdo (Figura 30) tornando-se cada vez mais uma ciência de destaque no mundo atual, onde as preocupações com a degradação do meio são imperiosas.

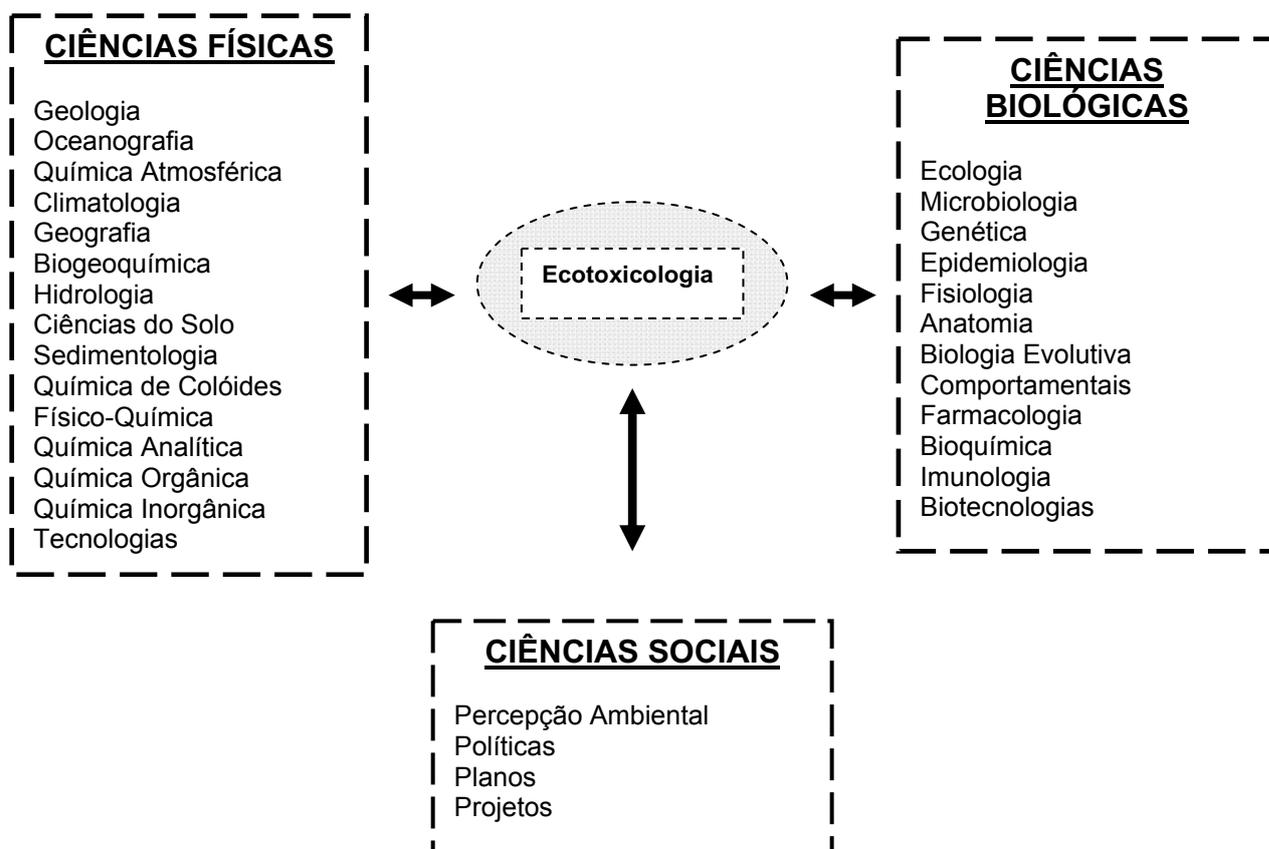


Figura 30 – Disciplinas que contribuem para a abordagem ecotoxicológica em avaliações ambientais. Adaptado de LANDIS & YU 1995 e NEWMAN & UNGER, 2003.

No Brasil a ecotoxicologia vem se consolidando como uma área da ciência imprescindível para a real caracterização dos impactos impingidos ao meio, tanto que a legislação federal através da resolução CONAMA 357/05 contempla a exigibilidade de ensaios ecotoxicológicos para determinação de condições e padrões dos efluentes a serem lançados nos corpos de água (§2º do Art. 34).

Reconhecimento sempre traz associados responsabilidades e desafios. Dentre muitos, talvez os dois maiores da ecotoxicologia brasileira sejam a incorporação de espécies nativas com potencial de aplicação em testes padronizados e o desenvolvimento de novas abordagens visando a “esclarecer” os efeitos dos poluentes sobre as complexas relações que regem as interações entre os seres vivos.

Nesta linha de pensamento, duas abordagens distintas foram efetuadas com o intuito de avaliar os efeitos de concentrações do EE2 para espécies nativas. A saber, o invertebrado *Ceriodaphnia silvestrii* e o vertebrado *Hyphessobrycon eques*.

4.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Executar ensaios ecotoxicológicos em concentrações ambientalmente relevantes do hormônio EE2 presente no Rio do Monjolinho, visando a obter respostas com o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* quanto a interferências reprodutivas e a exposição à predação por larvas de *Chaoborus sp.*
- Executar ensaios ecotoxicológicos em concentrações ambientalmente relevantes do hormônio EE2 presente no Rio do Monjolinho, visando a obter respostas com o peixe *Hyphessobrycon eques* quanto à produção da proteína vitelogenina (Vtg) quando comparado à espécie internacionalmente padronizada *Danio rerio*.

4.3 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 – Ensaio com *Ceriodaphnia silvestrii*

- Desenho experimental

Dois tratamentos complementares foram efetuados, primeiramente foram executados ensaios padronizados com o cladóceros nativo *Ceriodaphnia silvestrii* aplicando-se a norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 13373/2005) para ensaios de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia spp.* Nesta etapa, em duas baterias de testes se procurou avaliar os possíveis efeitos desencadeados pela concentração de EE2 encontrada no Rio do Monjolinho (Coleta 1 / Ponto 2). Para tanto foi feita a seguinte série de diluições: (22,0 ng.L⁻¹ / 100 %); (16,5 ng.L⁻¹ / 75 %); (11,0 ng.L⁻¹ / 50 %); (5,5 ng.L⁻¹ / 25 %); (2,75 ng.L⁻¹ / 12,5 %). O CENO (Concentração de Efeito Não Observado) foi calculado através de comparações múltiplas entre as médias das concentrações e dos controles. A montagem abaixo (Figura 31), ilustra etapas de desenvolvimento dos testes:

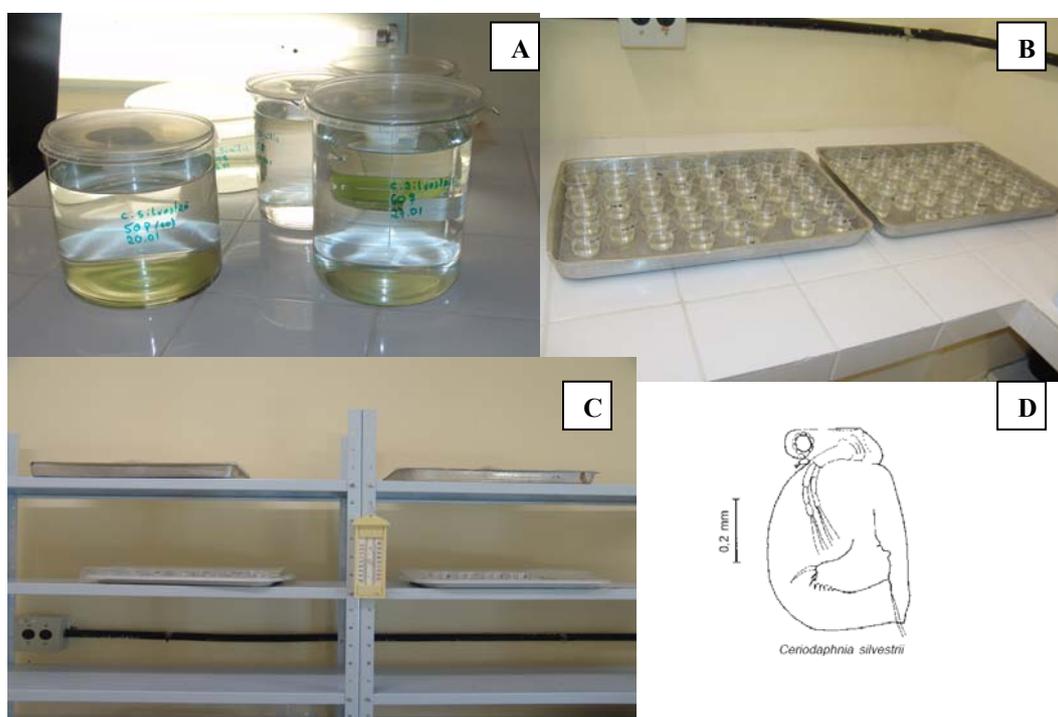


Figura 31 - A: cristalizadores onde são mantidas as culturas dos organismos; B: disposição dos recipientes-testes; C: manutenção dos ensaios em temperatura controlada; D: *Ceriodaphnia silvestrii* adulta (Desenho extraído de Tavares & Odete, 2003).

A partir das respostas e **observações** obtidas nestes ensaios mono-específicos, foi decidida a elaboração de um conjunto de testes não tradicionais que levasse em consideração relações entre espécies (interespecífico), no caso a relação predador-presa. Valendo-se de experimentos prévios onde foram determinadas preferências alimentares entre a fauna zooplancônica existente no ripado (área experimental da Universidade Federal de São Carlos), foram montados experimentos para avaliar possíveis diferenças na resposta predatória de larvas de *Chaoborus sp* (diptera) sobre o cladóceros nativo *C. silvestrii* quando expostos a concentração ambientalmente relevante de EE2.

A princípio foram realizados testes preliminares para determinação das condições ideais dos ensaios. Nestes primeiros experimentos quatro tratamentos foram aplicados em cinco réplicas. A Figura 32 exemplifica este primeiro conjunto de testes.

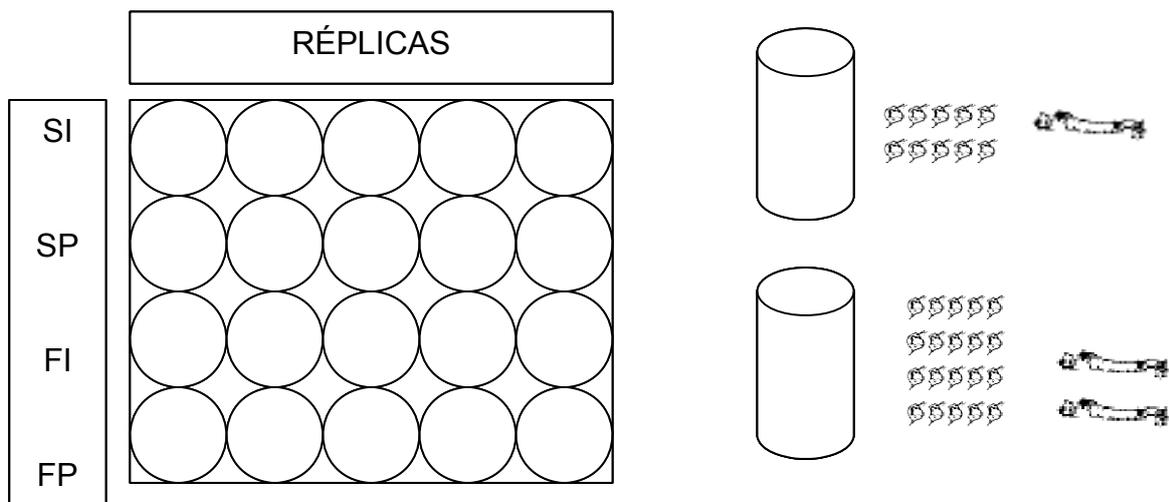


Figura 32 - Esquema demonstrando tipos de tratamentos desenvolvidos para avaliação das taxas de predação das larvas de *Chaoborus sp.* sobre *Ceriodaphnia silvestrii*. Frascos com 150 mL de água de cultivo. SI = 1 larva de *Chaoborus* mantida sem alimento (starvation) e incubada com 10 microcrustáceos; SP = 2 larvas de *Chaoborus* mantidas sem alimento e incubadas com 20 microcrustáceos; FI = 1 larva de *Chaoborus* pré-alimentada e incubada com 10 microcrustáceos; FP = 2 larvas de *Chaoborus* pré-alimentadas e incubadas com 20 microcrustáceos. Desenho fora de escala com função meramente ilustrativa.

Decorridas 24 horas os experimentos eram cessados e o número de microcrústaceos em cada recipiente teste era registrado, seguido da aplicação de fórmula para cálculo da taxa de predação.

Fórmula:

$$Tp = \frac{(Ti - Tf)}{Ti} \times 100$$

Onde: **Tp = Taxa de Predação**

Ti = N° de *C. silvestrii* no tempo inicial

Tf = N° de *C. silvestrii* no tempo final.

A próxima etapa consistiu em submeter os organismos ao EE2 na configuração do tratamento que se apresentou mais adequado. Assim três novas baterias de ensaios foram efetuadas. A primeira bateria foi realizada com os organismos submetidos à concentração de 22,0 ng.L⁻¹ de 17 alfa-etinilestradiol (EE2) e comparados com controles. Em função das diferenças observadas a segunda e terceira baterias foram desenvolvidas em ordens decrescentes de EE2 para avaliação de possíveis respostas discrepantes nas taxas de predação em relação às quantidades de hormônio no meio.

4.3.1 – Ensaio com *Hyphessobrycon eques*

- Desenho experimental

Cento e cinquenta exemplares adultos de *Danio rerio* (Paulistinha) e de *Hyphessobrycon eques* (Mato Grosso) foram obtidos de criador comercial credenciado e adaptados às condições laboratoriais por um período de 25 dias. Decorridos este intervalo foram transferidos para os aquários testes (Figura 34) e dispostos na configuração mostrada na Figura 35.



Figura 33 – Aquários experimentais com os peixes *D. rerio* e *H. eques*. Relação máxima de massa/volume de 1 g.L^{-1} (*D. rerio*) e $1,3 \text{ g.L}^{-1}$ (*H. eques*).

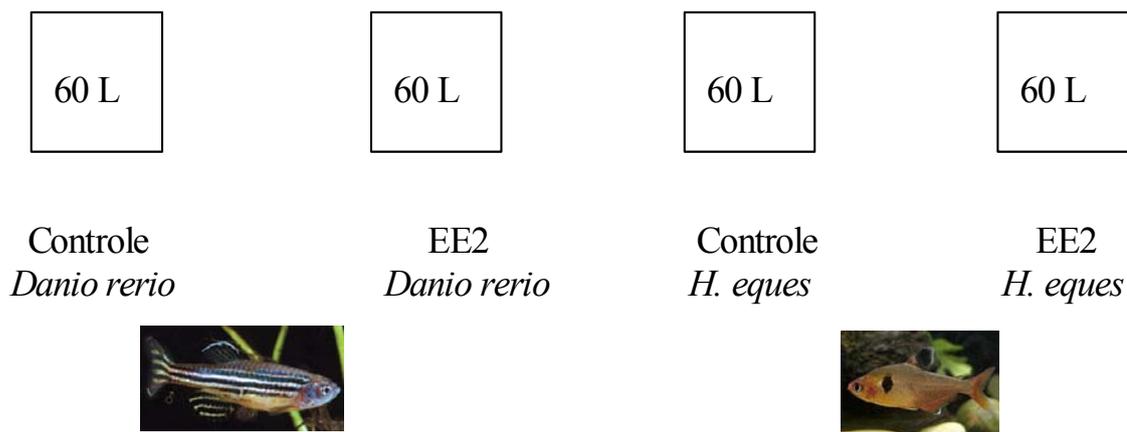


Figura 34 – Configuração dos testes de ciclo de vida parcial para as espécies *D. rerio* e *H. eques* expostas ao hormônio sintético etinilestradiol (EE2).

Os experimentos tiveram a duração de 60 dias (testes crônicos) com trocas de água semanais, ou seja, condição semi-estática com renovação de 25% do volume total a cada semana. A água utilizada nos experimentos foi preparada de acordo com as recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2004). A cada troca de água eram medidos o pH ($\sim 7,2$), a dureza ($\sim 40 \text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$), a temperatura ($\sim 24 \text{ }^\circ\text{C}$) e a concentração de O_2 dissolvido ($\sim 6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) para assegurar a qualidade do meio. A alimentação (Tetra®Min) foi administrada diariamente pelo período da manhã (0,2g por indivíduo) e o foto período estabilizado em 12/12. Nestas condições foram observadas possíveis alterações nas concentrações da proteína vitelogenina (Vtg) entre os peixes expostos a concentração nominal de EE2 $30 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ e os peixes controle através da aplicação de imunoenaios (Teste Elisa).

- Aplicação do protocolo para o teste Elisa

Decorridos os 60 dias, os peixes testados em ciclo de vida parcial foram anestesiados ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ benzocaína), medidos, pesados, embalados em filmes plásticos e etiquetados, para então serem imersos em nitrogênio líquido. A preparação dos homogenados (Figura 35) obedeceu a seguinte ordem:

- 1) Adição individual dos peixes em tubos próprios para homogenização juntamente com o tampão da amostra (Proporção 1:2 peso: volume). O tampão da amostra deve estar resfriado e ser constituído por: PBS (pH 7,2) + 1% BSA + 2 TIU de aprotinina /mL ($\sim 0,2 \mu\text{L}/\text{mL}$);
- 2) Homogenização das amostras sempre mantidas em gelo;
- 3) Transferência do homogenado para tubos eppendorf (previamente rotulados). Mantidos no gelo;
- 4) Centrifugação das amostras em 4°C , $16000\times\text{G}$ por 45'. Colocar os tubos no gelo;
- 5) Coletar o sobrenatante evitando gorduras que possam estar presentes no topo do centrifugado e transferir para novos tubos;
- 6) Executar análise ou estocar a -80°C .

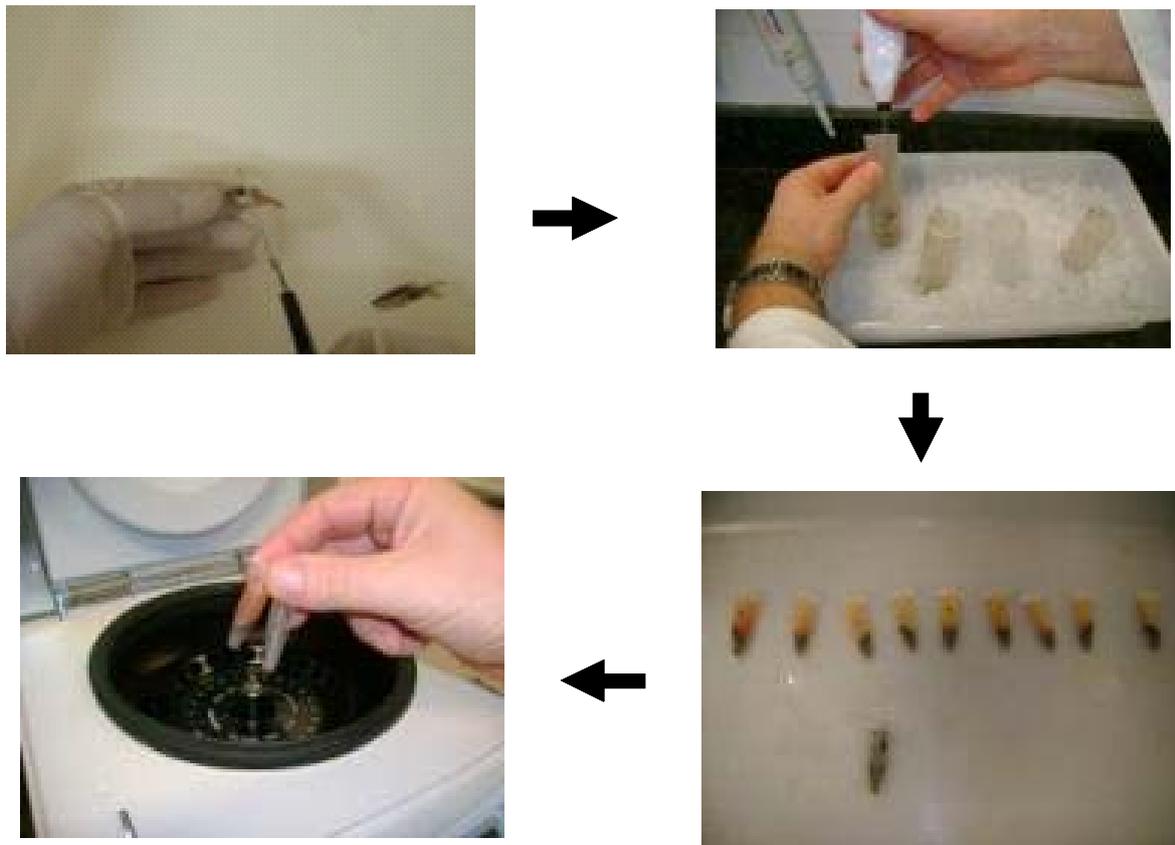


Figura 35 – Seqüência de passos que conduzem a obtenção de amostras para serem aplicadas ao teste Elisa.

A proposta de um teste ELISA do inglês “Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay”, é determinar se uma proteína em particular está presente em uma amostra e se, em qual quantidade. Para tanto um “sanduíche” é feito com as amostras, onde ligações específicas entre anticorpos e proteínas são realizadas, sendo a última camada composta por um substrato enzimático que permitirá a formação de cor cujas gradações serão detectadas por absorvância.

Portanto de posse das amostras preparadas, os procedimentos para a análise da Vtg seguiu uma série de etapas meticulosas, procurando evitar a degradação e contaminações que possam gerar resultados falsos positivos ou negativos. Uma apostila detalhada da metodologia empregada pode ser obtida no sítio do fornecedor dos padrões de vitelogenina. Acessar www.biosense.com e buscar por “Zebrafish Vitellogenin Elisa Kit” (Prod. no. V01008402). A ilustração abaixo (Figura 36), demonstra, de forma geral, os passos executados neste experimento.

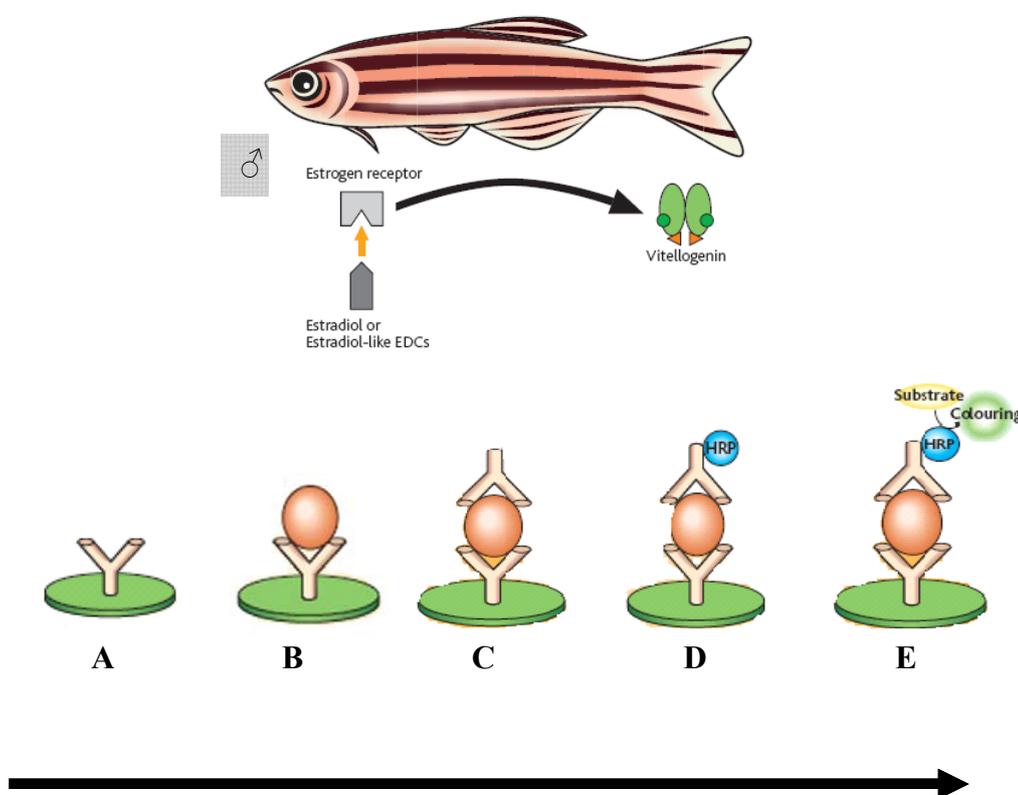


Figura 36 – Esquema representativo da produção de vitelogenina por peixe macho exposto a substância DE e seqüência de passos do ensaio Elisa que leva a detecção das quantidades de Vtg presente. (Montagem com desenhos Amersham Biosciences, <http://www.enbiotec.co.jp>)

Sendo a descrição dos passos a seguinte:

A – Placa pré-revestida com anticorpo de captura;

B – Adição de 100 µL de amostra* para cada poço e incubar por 1 hora em temperatura ambiente (20-25 °C). Após este período lavar a placa 3x com 300 µL do tampão de lavagem (PBS, 0,05% Tween-20);

C – Adição de 100 µL do anticorpo de detecção e incubar por 1 hora em temperatura ambiente. Após este período lavar a placa 3x com 300 µL do tampão de lavagem;

D – Adição de 100 µL do anticorpo secundário no qual esta aderida à enzima HRP (Horse Phosphatase) e incubar por 1 hora em temperatura ambiente. Após este período lavar a placa 5x com 300 µL do tampão de lavagem;

E – Adição de 100 µL da solução contendo o substrato crômico (Peróxido de uréia, OPD) e incubar por 30' ao abrigo da luz em temperatura ambiente. Após este período adicionar 50 µL de 2M H₂SO₄ (solução de parada) aguardar 5', ler a absorbância em 492 nm e calcular os resultados.

Como a placa de poliestireno para o teste Elisa é constituída por 96 poços marcados horizontalmente por números e verticalmente por letras foi preciso elaborar um mapa para ordenar as amostras a serem aplicadas e evitar confusão na identificação das mesmas (Figura 37).

O cálculo das concentrações da Vtg nas amostras seguiu as recomendações do protocolo supracitado. Assim as absorbâncias dos padrões de vitelogenina (P1 – P11) foram plotadas contra as suas respectivas concentrações e executada uma análise de regressão. A partir da equação gerada na regressão desta curva padrão, foi inserido as absorbâncias das amostras geradas no leitor de microplaca Elisa TP-READER (Thermo plate). Sendo o resultado de cada cálculo obtido multiplicado pelos fatores de diluição correspondentes (1:500, 1:30 000, e 1:1 800 000), para então, finalmente as concentrações médias de Vtg serem identificadas. A aplicação do teste de comparações de Bonferroni (Software Bioestat 2.0) foi executada para verificar possíveis diferenças significativas entre os tratamentos.

* Amostras preparadas em 3 diferentes diluições: 1:500, 1:30 000, e 1:1 800 000.

MAPA DA PLACA ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Br	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
B	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
C	DC1a	DC1b	DC1c	DC2a	DC2b	DC2c	DC3a	DC3b	DC3c	DE1a	DE1b	DE1c
D	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
E	DE2a	DE2b	DE2c	DE3a	DE3b	DE3c	MC1a	MC1b	MC1c	MC2a	MC2b	MC2c
F	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
G	MCC3a	MCC3b	MCC3c	ME1a	ME1b	ME1c	ME2a	ME2b	ME2c	ME3a	ME3b	ME3c
H	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

Br = Branco

P1 - P11 = Padrões

DCn(a,b,c) = D. rerio Controle (1ª Diluição, 2ª D, 3ª D)

DEn(a,b,c) = D. rerio exposto a EE2 (1ª Diluição, 2ª D, 3ª D)

MCn(a,b,c) = H. eques Controle (1ª Diluição, 2ª D, 3ª D)

MEN(a,b,c) = H. eques exposto a EE2 (1ª Diluição, 2ª D, 3ª D)

Figura 37 – Localização das amostras do homogenado de *D. rerio* e *H. eques* aplicadas na placa de Elisa.

4.4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 – Ensaio com *Ceriodaphnia silvestrii*

Os resultados em relação ao número médio de neonatas nascidas durante os dois experimentos estão plotados na Figura 38, onde pode ser observada a similaridade das respostas entre as duas baterias de testes realizados.

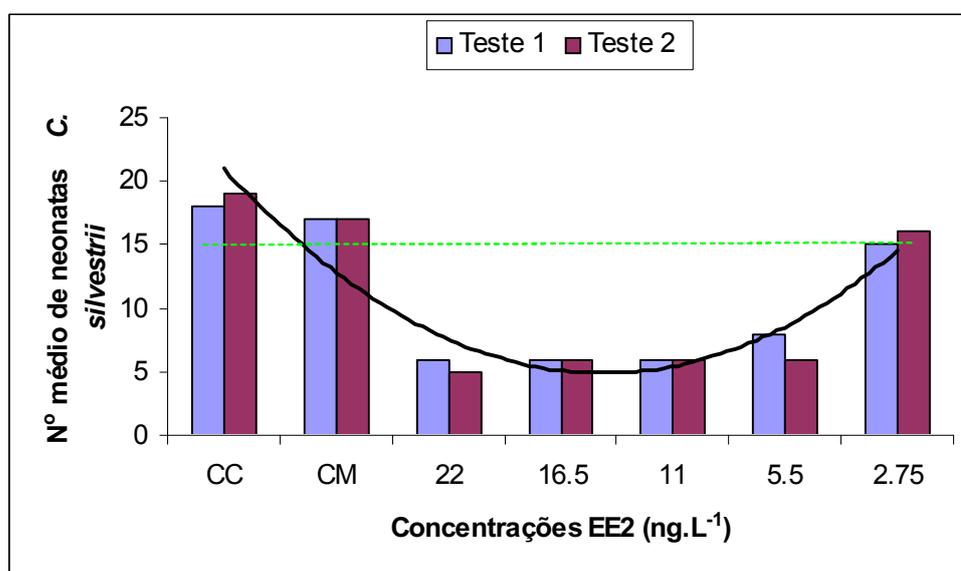


Figura 38 - Nº médio de neonatas produzidas durante testes de toxicidade crônicos com concentrações de 17 α -etinilestradiol (EE2). CC (Controle do cultivo/branco); CM (Controle do solvente/MeOH); A (22,00 ng.L⁻¹); B (16,50 ng.L⁻¹); C (11,00 ng.L⁻¹); D (5,50 ng.L⁻¹); E (2,75 ng.L⁻¹). Linha tracejada une os tratamentos onde não há diferença significativa ($\alpha = 0,05$)

Visualmente ao se observar a inflexão da linha de tendência traçada entre as médias de neonatas para ambos os testes, já pode ser notada a existência de diferenças entre os controles e concentrações teste. Estatisticamente, primeiramente foi executado um teste t entre o controle do solvente (CM) e o controle do cultivo (CC) onde foi mostrada a não existência de diferença significativa ($\alpha = 0,01$). Desse modo os dois controles foram combinados e comparados com as concentrações utilizadas. A análise de variância rejeitou a hipótese H_0 : todos os grupos são iguais, e a aplicação do teste de Kruskal-Wallis revelou que somente na concentração de 2,75 ng.L⁻¹ (para os dois testes) não houve diferença significativa em relação aos controles

($\alpha = 0,05$). Estes dados são de interesse ao se considerar a não existência de efeitos somente para a concentração que é 87,5 % diluída em relação à concentração ambientalmente relevante encontrada no Rio do Monjolinho. Ovos de resistência ou efípios não foram detectados em nenhuma das concentrações testadas, sendo aparentemente “apenas” a fecundidade dos organismos afetada.

Mesmo com os invertebrados representando mais que 95% de todas as espécies conhecidas do reino animal (OETKEN et al., 2003), o conhecimento da fisiologia hormonal principalmente das espécies aquáticas ainda é muito limitado (SÁNCHEZ & TARAZONA, 2002). De acordo com KASHIAN & DODSON 2004 vários estudos têm indicado a existência de reatividade entre hormônios de vertebrados e sítios receptores de invertebrados com potencial para desencadear efeitos deletérios. RODRIGUEZ et al. 2007 recentemente revisaram os efeitos de poluentes estrogênicos para crustáceos. Particularmente para cladóceros que são extensivamente utilizados em estudos ecotoxicológicos, embora avanços tenham ocorrido, existem ainda muitas controvérsias e certa nebulosidade em relação aos processos e mecanismos de ativação e regulação neuro-endócrinos, sendo muitas de suas funções meramente presumíveis (PINDER et al., 1999; LeBLANC, 2000; KASHIAN, 2002; OLMSTEAD, 2003).

Para o gênero *Ceriodaphnia*, O'CONNOR et al. 1992, encontraram redução da fecundidade para organismos expostos a efluentes oriundos de processos de produção de papel e celulose em concentrações tão baixas quanto 0,005 %. Este tipo de efluente constitui uma das principais misturas com ação desreguladora endócrina (SERVOS et al., 1996) logo demonstra a susceptibilidade do gênero frente a substâncias que induzem efeitos através das vias hormonais. Pesticidas (BANKS et al. 2005) comprovadamente estrogênicos e hormônios análogos aos juvenis (ODA et al., 2005) também desencadearam efeitos negativos (mortalidade, baixa fecundidade, geração de machos) para espécies de *Ceriodaphnia*.

Especificamente para EE2 o trabalho de JASER et al. 2003, apontou efeitos agudos para *C. reticulata* em $1814 \mu\text{g.L}^{-1}$ sendo que em experimentos crônicos exposições acima de $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ levaram ao encurtamento da fase reprodutiva e alta mortalidade para a prole. Porém a faixa de concentrações de

EE2 investigada nesse estudo (410 – 4100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para teste agudo e 10-500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para teste crônico) estão muito acima das concentrações testadas neste estudo o que infelizmente impossibilita comparações discriminatórias. Assim deve ser salientada a necessidade de estudos que englobem faixas de concentração amplas para que seja compreendido o comportamento do gênero frente ao estresse imposto pelo EE2. Também não devem ser desconsideradas as diferenças de sensibilidade apresentadas dentre espécies do mesmo gênero conforme já verificado com outras classes de poluentes por VERSTEEG et al., 1997 e BOSSUYT & JANSSEM 2005.

Uma observação importante notada durante os experimentos foi que nas réplicas expostas a maior concentração de EE2 (22,0 ng.L^{-1}) os organismos se movimentavam muito mais ativamente que nos controles e demais concentrações. Este fato empírico e aparentemente sem importância para a conformidade do ensaio padrão, gerou questionamentos quanto a possíveis efeitos secundários que a presença de hormônios poderia originar nas relações entre espécies, e levou a elaboração de testes predador-presa (PP).

O predatismo, assim como o herbivorismo, é a maneira pela qual a energia é transferida entre os níveis tróficos nos ecossistemas. Do ponto de vista individual existe prejuízo para as presas, porém considerando-se o aspecto populacional as populações de predadores e de presas geralmente mantêm um equilíbrio dinâmico, fundamental à sobrevivência de ambas. O primeiro conjunto de testes realizados avaliou qual configuração seria a mais adequada para divisar possíveis distúrbios nesta relação PP. A Figura 39 apresenta as respostas obtidas neste ensaio preliminar. Através de análises estatísticas (Teste de Tukey) foi confirmada a não diferença significativa entre os tratamentos com e sem alimento e existência de diferenças entre os tratamentos individuais e pareados ($p = 0,05$). Para a continuidade dos ensaios foi optado pelo uso dos tratamentos FI, ou seja, uma larva de *Chaoborus* pré-alimentada para 10 *Ceriodaphnia silvestrii* em cada recipiente teste. Esta configuração (mais restritiva) possibilita uma análise mais direcionada dos possíveis efeitos, pois desconsidera as influências como estímulos e competição entre as larvas de *Chaoborus*, as quais parecem elevar a taxa de predação e necessitam ser melhor observadas em experimentos futuros voltados exclusivamente para esse objetivo.

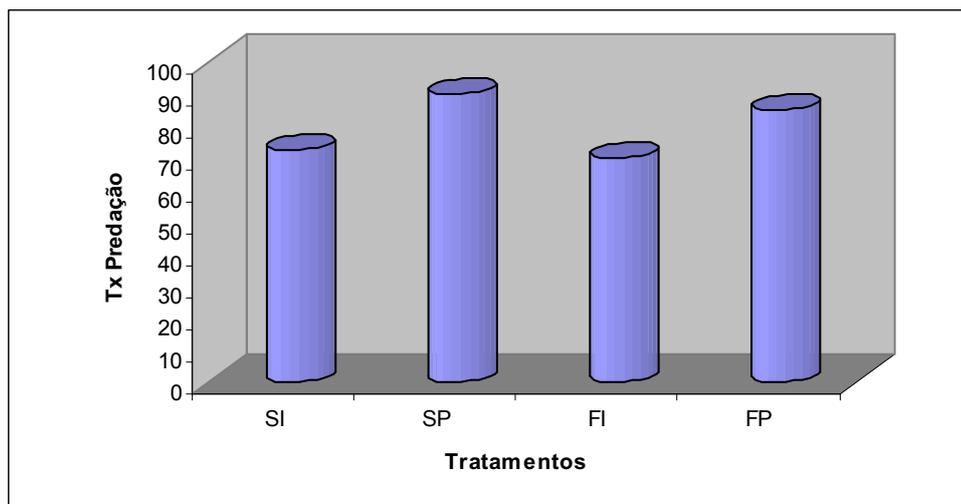


Figura 39 - Taxas de predação entre os diferentes tratamentos preliminares para as relações *Chaoborus sp* – *Ceriodaphnia silvestrii*. SI = 1 larva de *Chaoborus* mantida sem alimento (starvation) e incubada com 10 microcrustáceos; SP = 2 larvas de *Chaoborus* mantidas sem alimento e incubadas com 20 microcrustáceos; FI = 1 larva de *Chaoborus* pré-alimentada e incubada com 10 microcrustáceos; FP = 2 larvas de *Chaoborus* pré-alimentadas e incubadas com 20 microcrustáceos.

Assim três novas baterias de ensaios foram efetuadas. A primeira bateria foi realizada com os organismos submetidos à concentração de 22,0 ng.L⁻¹ de 17 alfa-etinilestradiol e comparados com controles. Em função das diferenças observadas (Figura 40) a segunda e terceira baterias foram desenvolvidas em ordens decrescentes de EE2 para avaliação de possíveis respostas discrepantes nas taxas de predação (Figuras 41).

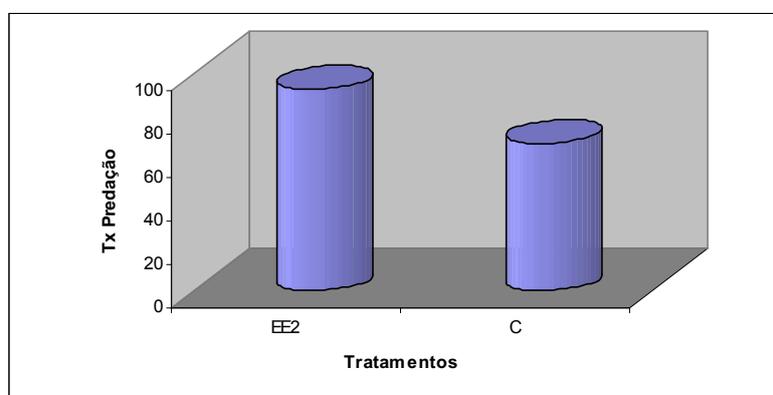


Figura 40 - Taxas de predação de *Chaoborus sp* sobre *C. silvestrii*. EE2 equivale a 22,0 ng.L⁻¹ de 17 alfa-etinilestradiol e C equivale aos controles. (Diferença significativa p=0,05 teste de Tukey)

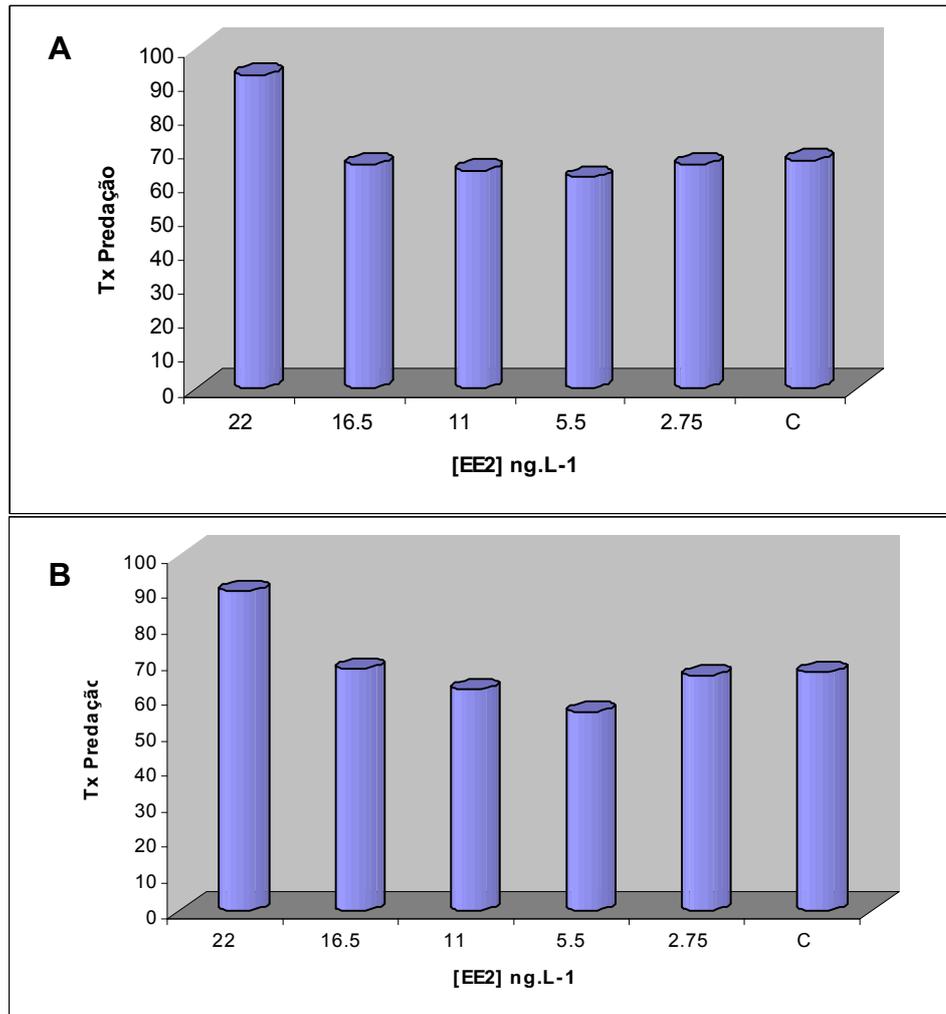


Figura 41 - Taxas de predação de *Chaoborus sp* sobre *C. silvestrii*. **A** – experimento em ordem decrescente de concentrações de EE2 (Diferença significativa $p=0,05$ teste de Tukeys entre EE2 $22,0 \text{ ng.L}^{-1}$ e controles). **B** - experimento em ordem decrescente de concentrações de EE2 (Diferença significativa $p=0,05$ teste de Tukeys entre EE2 $22,0 \text{ ng.L}^{-1}$ e controles).

Para ambos os ensaios apenas na concentração mais elevada de EE2 ocorreram diferenças nas taxas de predação em relação aos controles, corroborando experimento anterior. Como as larvas de *Chaoborus* localizam suas presas através de estímulos tácteis (mecanorreceptores) (ESTEVES, 1998), as vibrações na água ocasionadas pela mudança de comportamento das *Ceriodaphnia* expostas ao EE2 (movimentação acelerada) podem estar desencadeando este efeito. Conforme abordado em NEWMAN & UNGER 2003, desde a década de 1970 existem trabalhos relatando alterações nas relações PP envolvendo a exposição de diversos organismos a variadas classes de substâncias. PARMIGIANI et al. 2000, denominam o estudo destes desvios comportamentais de “eto-toxicologia”.

Muitas vezes o comportamento dos organismos (comportamento alimentar, de defesa, de migração, acasalamento, etc.) é iniciado por estímulos químicos denominados de “infochemicals” sendo os “kairomones” (substâncias emanadas pelo predador) uma “pista” (“cue”) que possibilita a presa se adequar à presença do predador (BRÖNMARK & HANSSON, 2000; BURKES & LODGE, 2002; VOS et al., 2006; VAN DONK, 2006), o hormônio sintético pode estar interferindo nestas mediações. O’KEEFE et al. 1998 e WEBER & Van NOORDWIJK 2002, através de registros em vídeo confirmaram que o decréscimo da atividade é o principal fator que permite a *Daphnia* diminuir sua vulnerabilidade a predadores (peixes e *Chaoborus* respectivamente).

Neste sentido, é de grande importância avaliar “endpoints” de relevância ecológica que possibilitem mensurar desequilíbrios causados por DE que venham a interferir na dinâmica das relações entre as espécies. A predação promovida por invertebrados é uma importante força seletiva nos ambientes pelágicos. Pela alimentação seletiva sobre o zooplâncton, os invertebrados planctívoros afetam características dos indivíduos, das populações e por consequência das comunidades e ecossistemas (SVENSSON, 1997).

Analisando em conjunto os resultados dos testes crônicos e de predação, infere-se que na presença de concentrações de EE2 as populações dos microcrustáceos podem estar sendo direcionadas para uma “zona de perigo” tanto em função do menor número de neonatas geradas quanto da predação maior a que são submetidos. Em contrapartida, observando pelo ângulo do predador, ao longo do tempo haverá menos alimento o que vai levar o *Chaoborus* a redirecionar sua pressão predatória a outros organismos, com possibilidade de gerar desequilíbrio nas teias tróficas que podem perturbar todo o ecossistema.

4.4.2 – Ensaio com *Hyphessobrycon eques*

Devido ao seu elevado poder de detecção e especificidade, reação cruzada extremamente baixa com outros compostos a não ser a proteína alvo, além de propiciar a análise de várias amostras ao mesmo tempo, as respostas dos ensaios com Elisa permitiram um excelente discernimento entre os testes de toxicidade realizados. Já durante a leitura das amostras foi possível identificar empiricamente a existência de diferenças em razão da coloração discrepante entre os poços dos grupos controle e tratamentos (Figura 42). Sendo posteriormente, os resultados confirmados estatisticamente pelo teste de Bonferroni, com um nível de significância de 99% para a espécie *D. rerio* e de 95 % para a espécie *H. eques*, aplicado às concentrações determinadas pelo ajuste de uma regressão logarítmica (Figura 43).

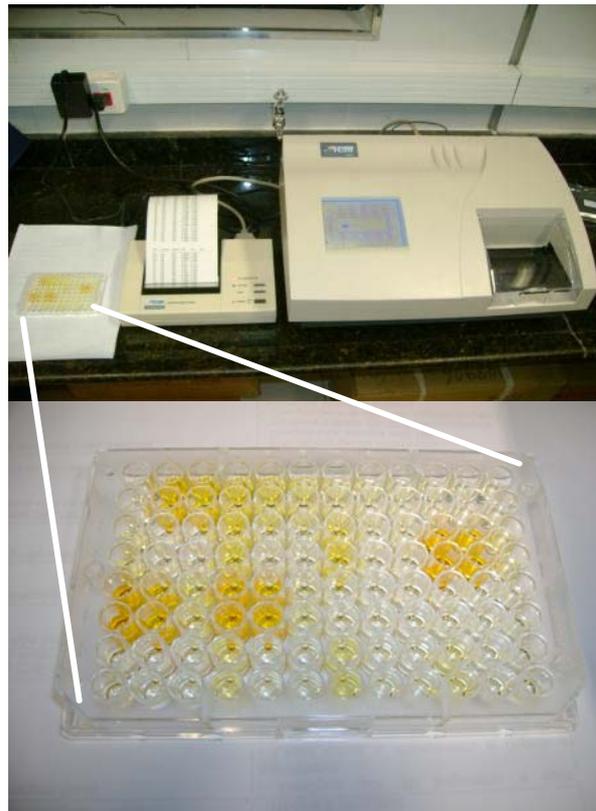


Figura 42 – Leitora de microplaca Elisa TP-READER (Thermo plate) e resultados dos ensaios sendo impressos. Destaque: Placa do teste Elisa após a aplicação da solução de parada com colorações divergentes entre os poços analisados.

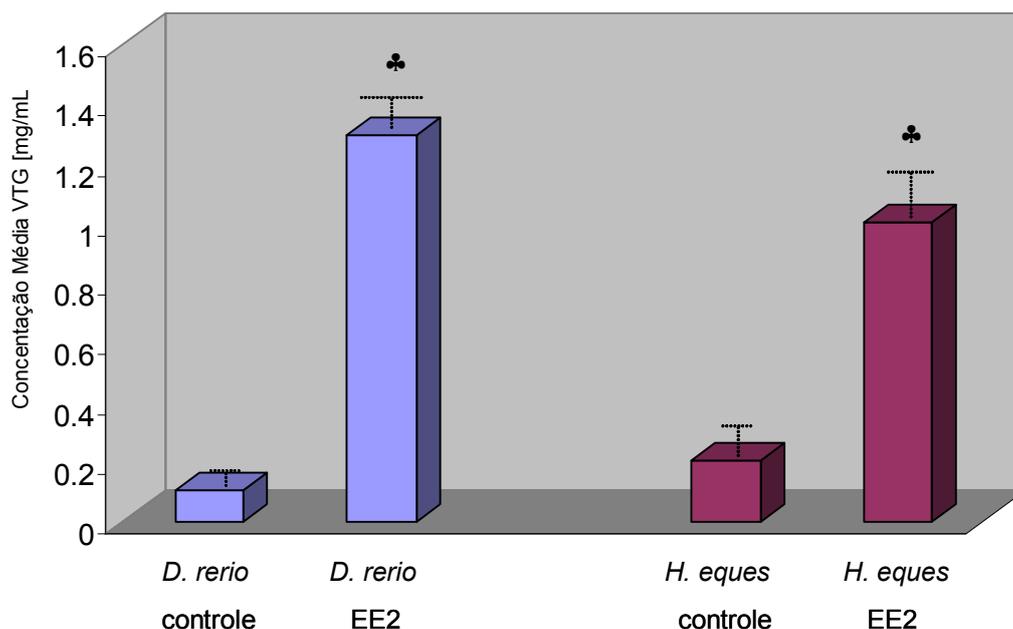


Figura 43 – Concentrações médias de vitelogenina analisadas em homogenados de peixes mantidos em condições semi-estáticas por 60 dias. Concentração teste de EE2 de 30 ng/L. Barras representam os valores máximos. ♣ Representa diferença significativa em relação ao controle (99% para *D. rerio*, 95% para *H. eques*). *D. rerio* controle (n=16), *D. rerio* EE2 (n=12), *H. eques* controle (n=15), *H. eques* EE2 (n=9).

Para a espécie nativa *Hyphessobrycon eques* não existem relatos na literatura, até o presente momento, quanto aos efeitos de substâncias estrogênicas. A elevação da indução de vitelogenina para o *Danio rerio* encontrada neste trabalho, corrobora valores encontrados por outros pesquisadores em situações experimentais diversas. Como principais estudos temos Van Den BELT et al., 2003 que determinaram uma relação dose-dependente de acreção da Vtg no **plasma** de *D. rerio* expostos a EE2 encontrando uma significativa indução (7 mg/mL) já a partir de 5 ng EE2.L⁻¹. Neste mesmo trabalho os autores relatam as dificuldades em se compararem medidas de Vtg entre estudos distintos, tanto para diferentes espécies quanto para a mesma espécie a fim de se estabelecer uma concentração de efeito mínima (LOEC). NASH et al., 2004 ao examinar o **sangue** de danios expostos a EE2 por 40 dias encontrou valores muito próximos de Vtg aos determinados neste estudo (~1 mg/mL); aferindo um aumento de até 5000 vezes nas quantidades de Vtg em relação aos controles já a partir de doses mínimas de

EE2 ($0,5 \text{ ng.L}^{-1}$), porém estas quase não variaram quando os peixes foram submetidos a concentração 100 vezes maiores de EE2 (50 ng.L^{-1}). Observando em distintas fases do ciclo de vida as variações de Vtg em **homogenados** para danios submetidos continuamente desde a fertilização a 3 ng EE2.L^{-1} , FENSKE et al., 2005 encontraram após 75 dias concentrações de Vtg de até $1,36 \text{ mg/mL}$. Valores esses semelhantes aos encontrados neste estudo, embora os peixes tenham sido expostos a concentrações 10 vezes maiores já na fase adulta.

Inúmeros outros trabalhos registram aumento de Vtg para diversas espécies expostas a EE2 em quantidades variadas e em tempos diversos do ciclo de vida, porém para efeito de comparações atenção deve ser dada a matriz em estudo. Pois análises de plasma tendem a apresentar valores mais elevados do que as realizadas com sangue completo e homogenados, devido às diluições implícitas nos estudos (quantidades de tecidos que compõe o volume a ser analisado). Ainda deve ser frisado que as concentrações de Vtg em peixes expostos a desreguladores endócrinos podem variar milhares de vezes desde poucos ng/mL até mg/mL (TYLER et al., 1990, ARUKWE & GOKSØYR, 2003), também dependendo da fase do ciclo de vida, sexo e espécie avaliada.

Neste experimento, as variações das concentrações de Vtg entre os indivíduos expostos a EE2 não foram significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$) entre *H. eques* e *D. rerio*. Este é um fato de relevante importância, pois embora o teste Elisa aplicado não seja destinado à espécie nativa de águas brasileiras, e por isso a análise para *H. eques* deve ser considerada semi-quantitativa, o anticorpo de detecção reagiu positivamente ao tipo de Vtg existente na espécie. Portanto enquanto não for desenvolvido algum ensaio específico para *H. eques*, como estudos de purificação da Vtg, o teste Elisa existente no mercado para a espécie *D. rerio* pode ser adaptado para *H. eques* na avaliação do potencial de desregulação endócrina de amostras ambientais. Enfatizando que o emprego de uma espécie da fauna silvestre confere maior representatividade ecológica as investigações realizadas.

4.4 – REFERÊNCIAS

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). 2004. Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de Ensaio com Peixes. NBR 15088: 2004.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). 2005. Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Crônica – Método de Ensaio com *Ceriodaphnia spp* (Crustacea, Cladocera). NBR 13373: 2005.
- ARUKWE, A. & GOKSØYR, A. 2003. Eggshel and egg yolk proteins in fish: Hepatic proteins for the next generation: Ooogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comparative Hepatology*, 2:4. Disponível em: <http://www.comparative-hepatology.com/content/2/1/4>
- BANKS, K.E., TURNER, P.K., SYLVIA, H.W., MATTHEWS, C. 2005. Increased toxicity to *Ceriodaphnia dubia* in mixtures of atrazine and diazinon at environmentally realistic concentrations. *Ecotox. Environ. Saf.*, 60: 28-36.
- BOSSUYT, B.T. & JANSSEN, C.R. 2005. Copper toxicity to different field-collected cladoceran species: Intra-and inter-species sensitivity. *Environmental Pollution*, 136: 145-154.
- BRÖNMARK, C. & HANSSON, L-A. 2000. Chemical communication in aquatic systems: An introduction. *OIKOS*, 88: 103-109.
- BURKS, R.L. & LODGE, D.M. 2002. Cued in: Advances and opportunities in freshwater chemical ecology. *J. Chem. Ecol.*, 28(10): 1901-1917.
- CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). Resolução N° 357, de 17 de Março de 2005.
- ESTEVEES, F. De ASSIS. 1998. Comunidade Zooplantônica. In: ESTEVEES, F. De ASSIS. *Fundamentos de Limnologia*. Interciência. pp. 442-484.
- FENSKE, M., MAACK, G., SCHÄFERS, C., SEGNER, H. 2005. An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24(5): 1088-098.
- JASER, W., SEVERIN, G.F., JÜTTING, U., JÜTTNER, I., SCHRAMM, K-W., KETTRUP, A. 2003. Effects of 17 α -ethinylestradiol on the reproduction of the cladoceran species *Ceriodaphnia reticulata* and *Sida crystalina*. *Environment International*, 28: 633-638.
- KASHIAN, D. 2002. Reproduction and development in *DAPHNIA*: The role of hormones, pesticides and detoxification. University of Wisconsin-Madison, (Tese). 92p.

KASHIAN, D.R. & DODSON, S.I. 2004. Effects of vertebrate hormones on development and sex determination in *Daphnia magna*. Environ.Toxicol. Chem., 23 (5): 1282-1288.

KOEMAN, J.H. 1998. Pollution and its Ecotoxicological Consequences. In: LYNCH, J.M. & WISEMAN, A. Environmental Biomonitoring: The Biotechnology Ecotoxicology Interface. Cambridge University Press. pp. 17-26.

LANDIS, W.G. & YU, M.H. 1995. Introduction to Environmental Toxicology. Lewis Publishers. 328p.

LeBLANC, G.A. 2000. Steroid Hormone-Regulated Processes in Invertebrates and Their Susceptibility to Environmental Endocrine Disruption. In: GUILLETTE Jr., L.J. & CRAIN, D.A. (eds). Environmental Endocrine Disrupters : An Evolutionary Perspective. Taylor & Francis. pp. 126-154.

NASH, J.P., KIME, D.E., Van der Ven, L.T.M., WESTER, P.W., BRION, F., MAACK, G., STAHLSCHMIDT-ALLNER, P., TYLER, C.R. 2004. Long-Term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. Environ. Health Perspect., 112: 1725-1733.

NEWMAN, M.C. & UNGER, M.A. 2003. Fundamentals of Ecotoxicology. CRC Press. 458p.

NEWMAN, M.C. & UNGER, M.A. 2003. Effects to Communities and Ecosystems. In: NEWMAN, M.C. & UNGER, M.A. 2003. Fundamentals of Ecotoxicology. CRC Press. pp. 235-256.

O'CONNOR, B.I., KOVACS, T.G., VOSS, R.H. 1992. The effect of wood species composition on the toxicity of simulated mechanical pulping effluents. Environ. Toxicol. Chem., 11: 1259-1270.

ODA, S. TATARAZAKO, N., WATANABE, H., MORITA, M., IGUCHI, T. 2005. Production of male neonates in four cladoceran species exposed to a juvenile hormone analog, fenoxycarb. Chemosphere, 60: 74-78.

O'KEEFE, T.C., BREWER, M.C., DODSON, S.I. 1998. Swimming behavior of *Daphnia*: Its role in determining predation risk. J. Plankton Res., 20(5): 973-984.

OLMSTEAD, A.W. 2003. Environmental toxicants effects on sexual reproduction in *DAPHNIA MAGNA*. North Carolina State University, (Tese). 148p.

OETKEN, M., BACHMANN, J., SCHULTE-OCHLMANN, U., OCHLMANN, J. 2003. Evidence for endocrine disruption in invertebrates. Parasitology, 126: 103-108.

PARMIGIANI, S. PALANZA, P., Vom SAAL, F.S. Ethotoxicology: An Evolutionary Approach to Behavioral Toxicology. In: GUILLETTE Jr., L.J. &

CRAIN, D.A. (eds). Environmental Endocrine Disrupters : An Evolutionary Perspective. Taylor & Francis. pp. 217-233.

PINDER, L.C.V., POTTINGER, T.G., BILLINGHURST, Z., DEPLEDGE, M.H. 1999. Endocrine Function in Aquatic Invertebrates and Evidence for Disruption by Environmental Pollutants. UK Environmental Agency, Technical Report E67. 156p.

RODRÍGUEZ, E.M., MEDESANI, D.A., FINGERMAN, M. 2007. Endocrine disruption in crustacean due to pollutants: A review. Comp. Bioch. Physiol. Part A, 146: 661-671.

SÁNCHEZ, P. & TARAZONA, J.V. 2002. Development of a multispecies system for testing reproductive effects on aquatic invertebrates. Experience with *Daphnia magna*, *Chironomus prasinus* and *Lymnae peregra*. Aquatic Toxicology, 60: 249-256.

SERVOS, M.R., MUNKITTRICK, K.R., CAREY, J.H., VAN DER KRAAK, G.J. 1996. Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents. St. Lucie Press. 703p.

SVENSSON, J.E. 1997. *Chaoborus* predation and sex – specific mortality in a copepod. Limnol. Oceanogr., 42 (3): 572-577.

TAVARES, L.H.S. & ODETE, R. 2003. Produção de Plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para Alimentação de Organismos Aquáticos. Rima Editora. 106p.

TYLER, C.R., SUMPTER, J.P., WITTHAMES, P.R. 1990. The dynamics of oocyte growth during vitellogenesis in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Biol. Reprod., 43: 202-209.

Van den BELT, K., VERHEYEN, R., WITTERS, H. 2003. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. Ecotox. Environ. Saf., 56: 271–281.

Van DONK, E. 2006. Food-Web Interactions in Lakes. In: DICKE, M. & TAKKEN, W. (eds). Chemical Ecology: From Gene to Ecosystem. Springer. pp. 145-160.

VERSTEEG, D.J., STALMANS, M., DYER, S.D., JANSSEN, C. 1997. *Ceriodaphnia* and *daphnia*: A comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. Chemosphere, 34 (4): 869-892.

VOS, M., VET, L.E.M., WÄCKERS, F.L., MIDDELBURG, J.J., Van der PUTTEN, W.H., MOOIJ, W.M., HEIP, C.H.R., Van DONK, E. 2006. Infochemicals structure marine, terrestrial and freshwater food webs: Implications for ecological informatics. Ecol. Informatics, 1: 23-32.

WEBER, A. & Van NOORDWIJK, A. 2002. Swimming behaviour of *Daphnia* clones: Differentiation through predator infochemicals. *J. Plankton Res.*, 24(12): 1335-1348.

CAPÍTULO 5:
AVALIAÇÃO DE
RISCO
AMBIENTAL



Avaliação de
Risco Integrado



5.1 – Introdução ao Tópico

As fotografias que ilustram o início deste capítulo foram obtidas ou são produtos de análise do próprio Rio do Monjolinho. Elas visualmente ressaltam a premissa que a avaliação de risco para a saúde humana e ecossistemas, transcende em muito as concentrações de uma determinada classe de poluentes presentes na área de estudo. Estas concentrações são sinais, o ponto de partida que se relaciona com toda uma série de fatores, muitos dos quais indiretos e de difícil discernimento, responsáveis em conjunto pelos impactos negativos.

BIKSEY & BERNHARDT 2000, apontam a evolução das abordagens metodológicas ao se conduzir uma avaliação de risco ambiental, destacando a importância do fluxo de informações entre técnicos, políticos e a comunidade. A Figura 44 representa as relações e funções de uma análise integrada.

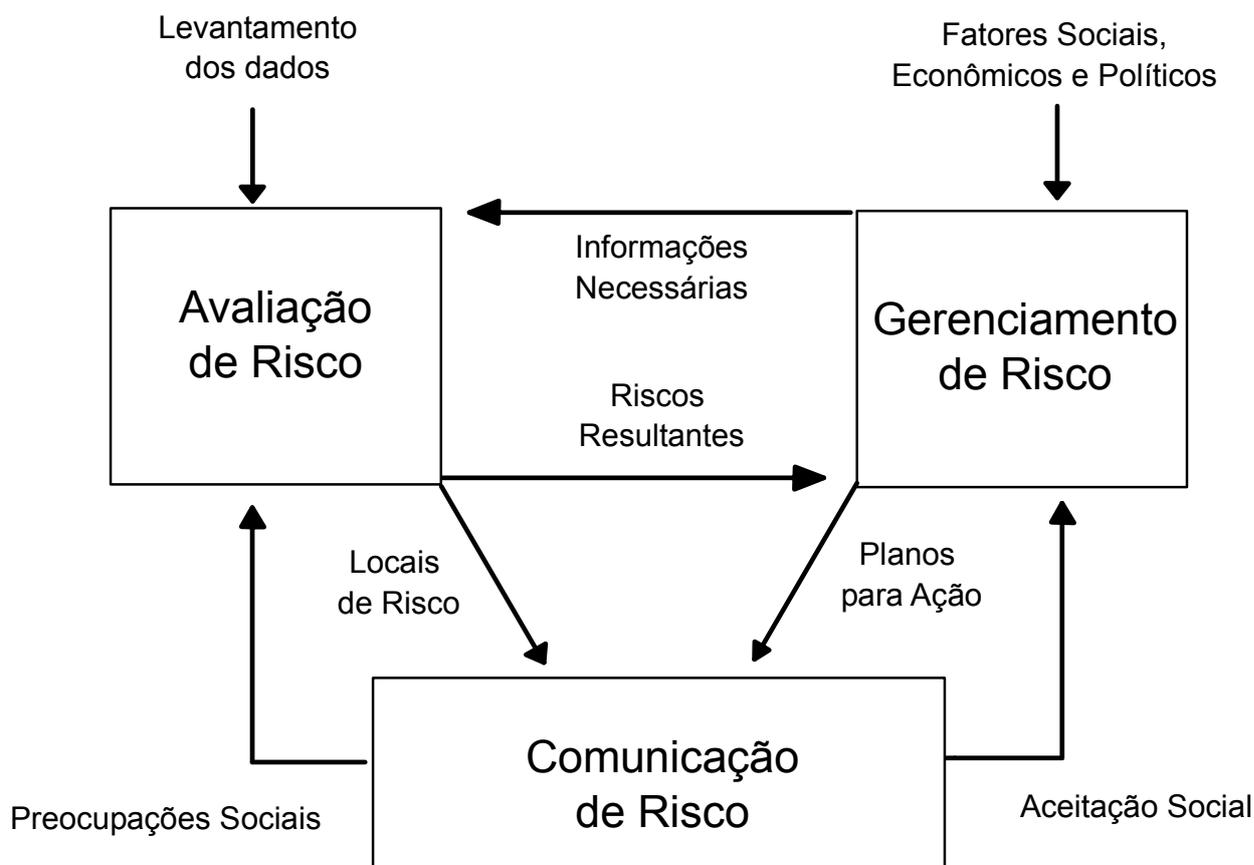


Figura 44 - Componentes e inter-relações de uma análise de risco. (Modificado de BIKSEY & BERNHARDT, 2000).

5.2 – Percepção Ambiental

Pensar em analisar a existência de algum risco que comprometa a qualidade ambiental, deve antes de tudo passar pela compreensão de como a população humana inserida e/ou usuária do espaço comprometido percebe (preocupa-se) com o estado vigente. A percepção da situação ambiental local é muita, se não a maioria das vezes suprimida pela midiática apresentação de problemas globais. O local deve ser retirado da margem e colocado no cerne do interesse, se tornar o ponto de partida e chegada para o conhecimento e incorporações das questões ambientais associadas à gerência do meio vivente.

Muitas das dificuldades encontradas nas tentativas de resolução de problemas ambientais residem na não percepção (ou percepção superficial) destes problemas pela população. Uma avaliação de risco para ser completa deve conter em seu escopo a percepção da população do objeto em estudo (WILLIS et al. 2005; GRASMÜCK & SCHOLZ 2005). Sendo a participação pública recomendada como um modo efetivo de abordar questões ambientais (TRAN et al. 2002).

Embora a visão humana da qualidade ambiental dependa da história de vida e formação sócio-cultural do indivíduo, foi desenvolvido um questionário reunindo questões direcionadas (optativas) e abertas buscando avaliar o grau de conhecimento em relação aos problemas do Rio do Monjolinho, de modo que a linguagem empregada fosse bem aceita nas diferentes camadas sociais. Sendo que em algumas questões, a percepção sensorial das pessoas em relação ao meio em que estão inseridas também é perscrutada.

Um total de 220 cópias foi distribuído para os residentes e comerciantes da bacia do Monjolinho, incluindo o shopping da cidade, com o retorno de 70% (154) dos questionários.

Para as questões abertas, a atribuição de escalas se baseou no comprometimento das respostas considerando a seriedade e o grau de conhecimento em relação às perguntas. Assim, modificando WHITE & HUNTER 2005, foram atribuídas as seguintes classes as respostas obtidas: **-1 = fraco, 0 = não sei, 1 = bom, 2 = muito bom.**

Projeto de Doutorado FAPESP 03/05772-0
Questões sobre o Ambiente e o Rio do Monjolinho

Por favor, responda as questões abaixo. Elas foram elaboradas com a intenção de observar importantes opiniões sobre aspectos do meio ambiente urbano.

Idade:

Até 15 anos 15 – 25 25 – 40 40 – 60 Superior a 60

Profissão: _____

Escolaridade:

Ensino Básico Ensino Médio Ensino Técnico Ensino Superior

1) Qual sua sensação visual ao passar pelas vias marginais do Rio do Monjolinho (Trajeto USP- Shopping) ?

Agradável Ruim Indiferente

2) Você acha importante a existência da mata ciliar (mata ao redor das margens) em rios urbanos?

Sim Não Indiferente **Por quê?**

3) Como você classificaria o cheiro próximo as marginais?

Ótimo Bom Ruim Péssimo Indiferente

4) Qual (is) a(s) causa(s) desse cheiro? _____

5) Você se preocupa com o destino de esgotos?

Sim Não Indiferente

Você acha que as outras pessoas têm esta preocupação?

Sim Não

Sabe onde os esgotos são atualmente lançados?

6) Em relação à ETE (estação de tratamento de esgotos) que está sendo construída em nossa cidade, qual a sua importância? _____

7) Você comeria um peixe pescado no Rio do Monjolinho?

Sim Não **Por quê?**

8) Como você descarta os remédios vencidos ou não usados?

Lixo comum Vaso sanitário Lixo e Vaso sanitário Outra forma: _____

9) Em sua opinião, a população é esclarecida em relação aos problemas ambientais da cidade? Cite alguns problemas que você considera importante!

10) Comente esta fotografia tirada no Rio do Monjolinho no começo deste ano.

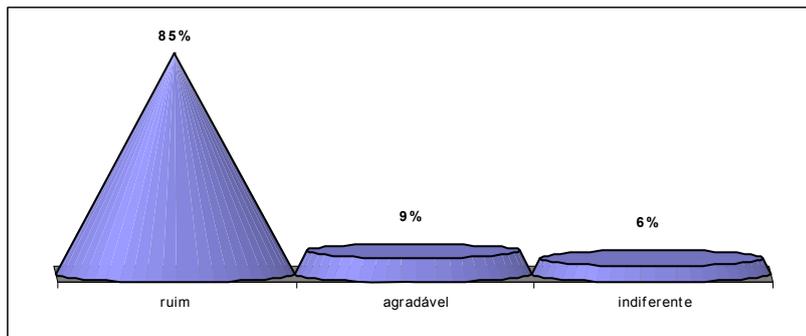


OBRIGADO PELA SUA COLABORAÇÃO!

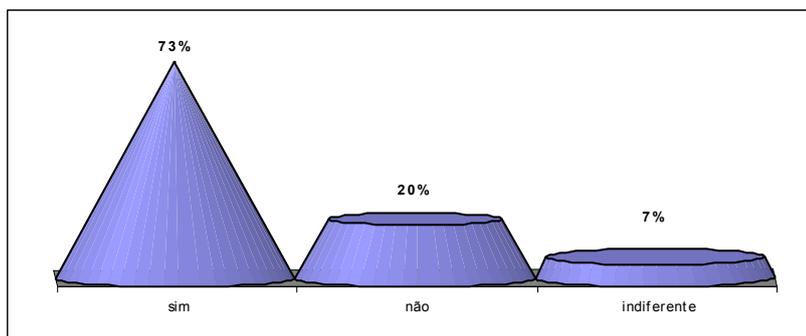
A série de gráficos abaixo é o resultado final do tratamento dos questionários.

Perguntas Optativas:

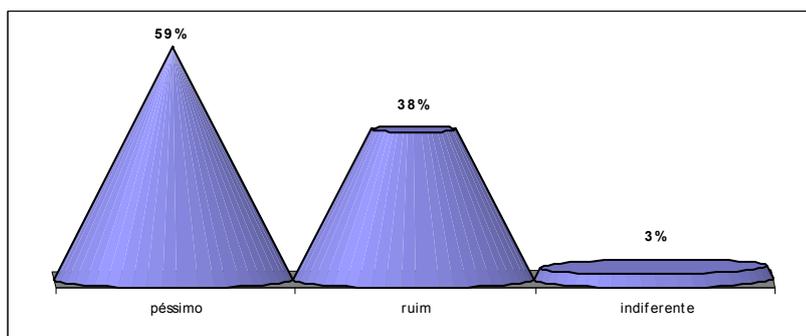
Pergunta 1: Qual a sua sensação visual ao passar pelas vias marginais do Rio do Monjolinho?



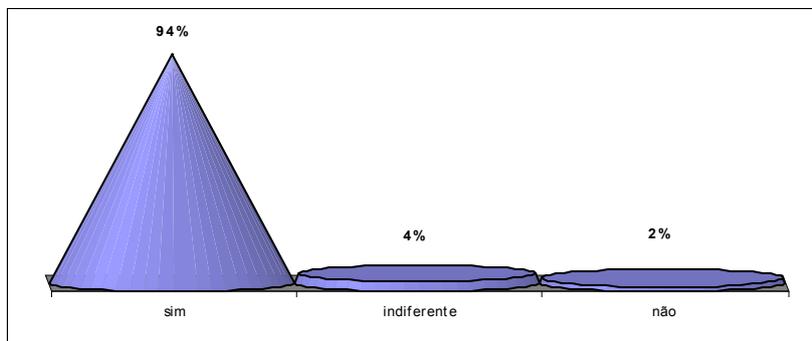
Pergunta 2: Você acha importante a existência da mata ciliar (mata ao redor das margens) em rios urbanos?



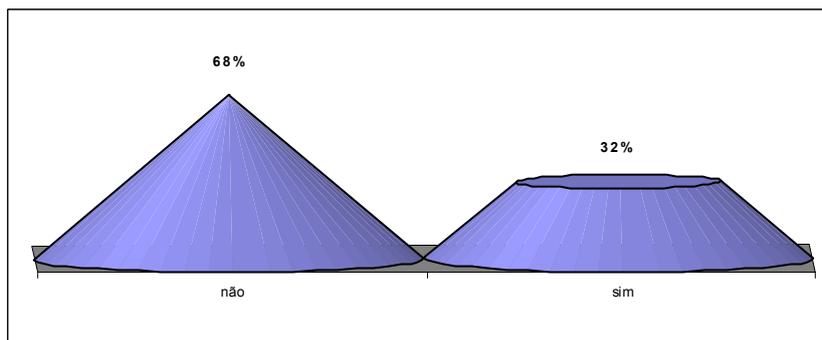
Pergunta 3: Como você classificaria o cheiro próximo as marginais?



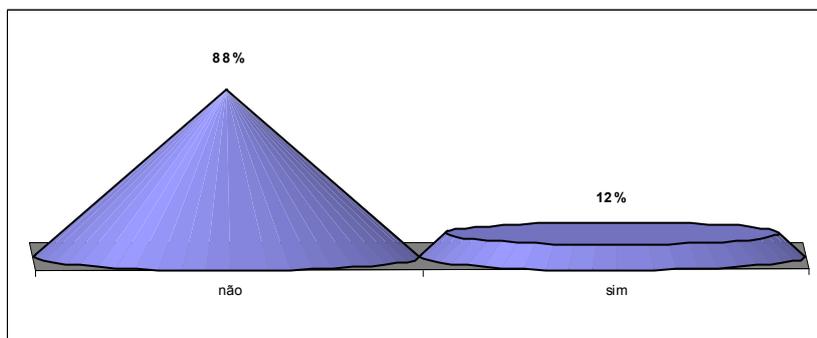
Pergunta 5a: Você se preocupa com o destino dos esgotos?



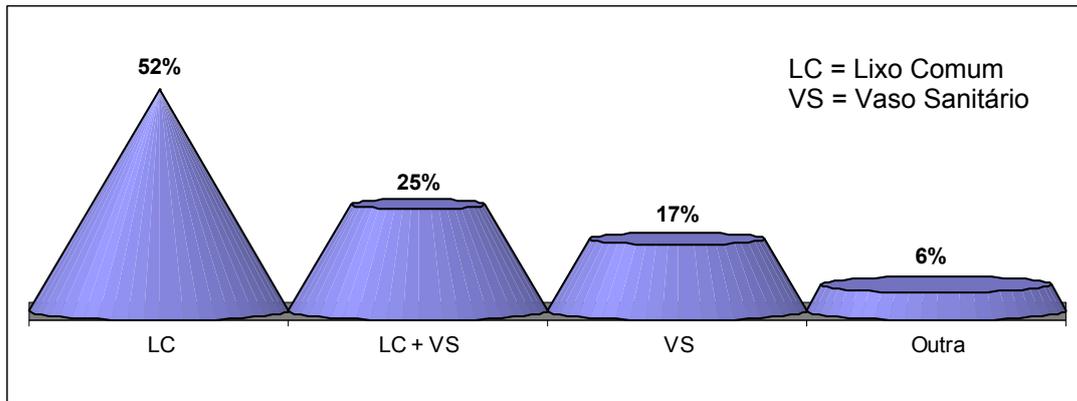
Pergunta 5b: Você acha que as outras pessoas têm esta preocupação?



Pergunta 7: Você comeria um peixe pescado no Rio do Monjolinho?

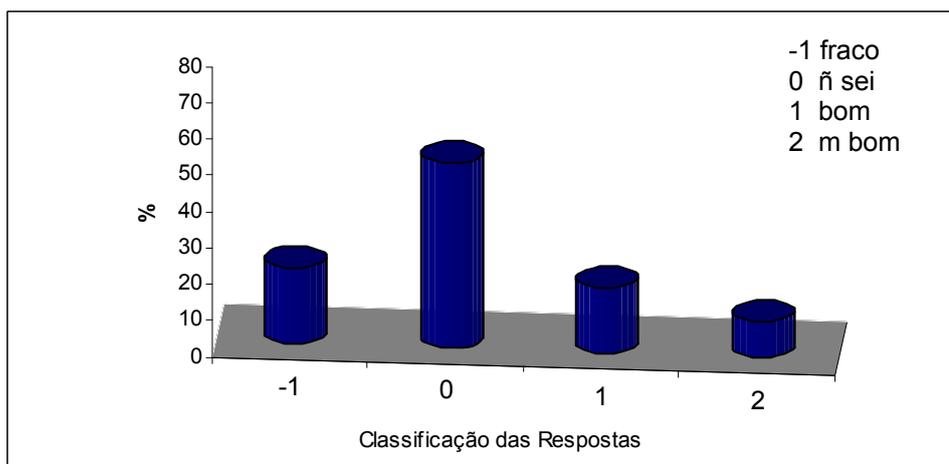


Pergunta 8: Como você descarta os remédios vencidos ou não usados?

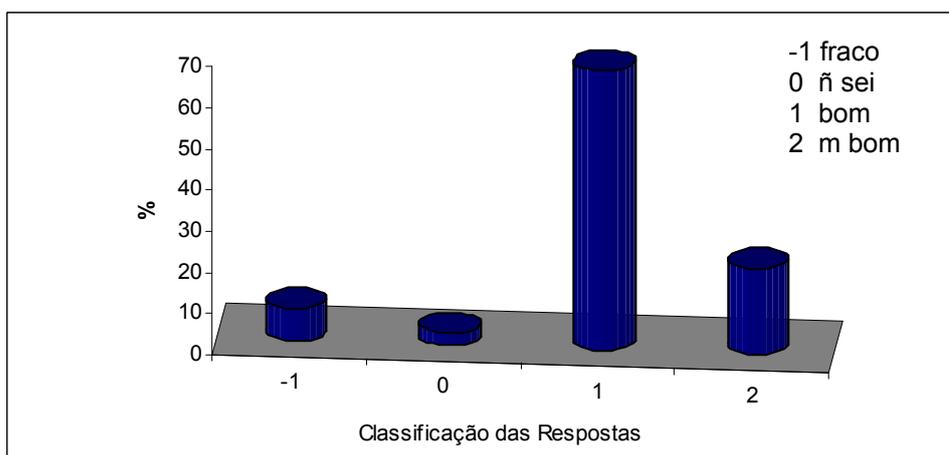


Questões Abertas:

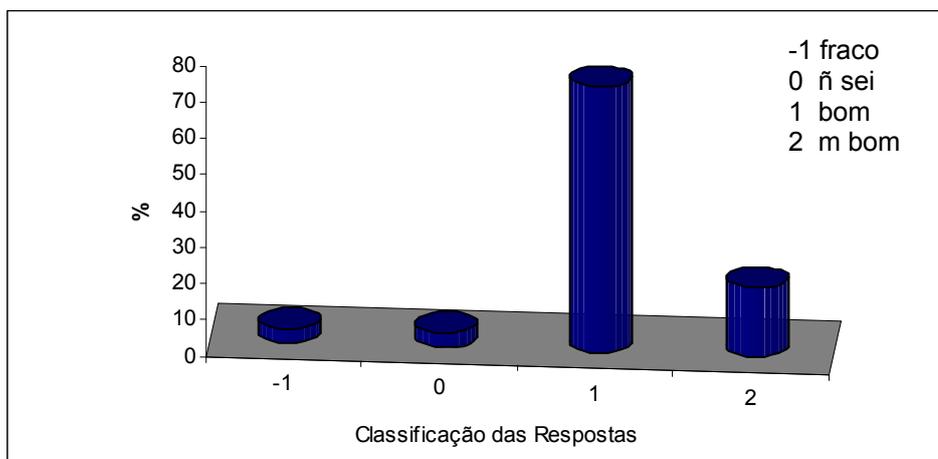
Questão 2: Importância da mata ciliar?



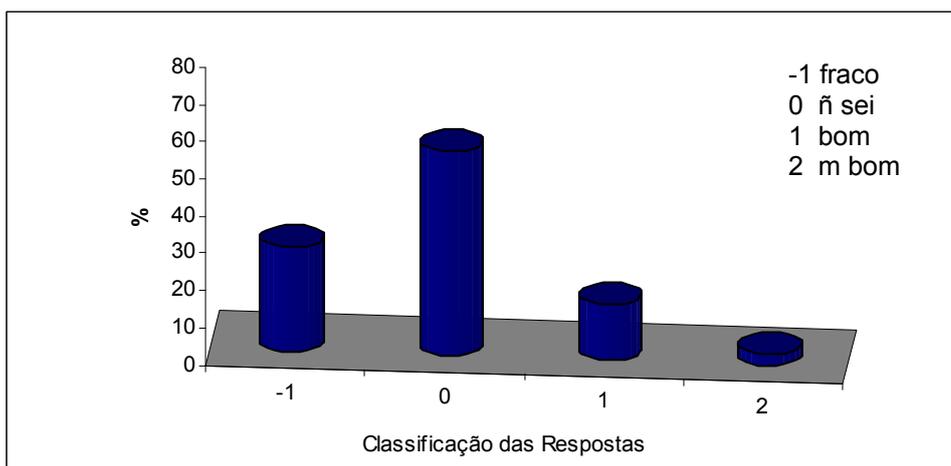
Questão 4: Causas do cheiro junto as marginais?



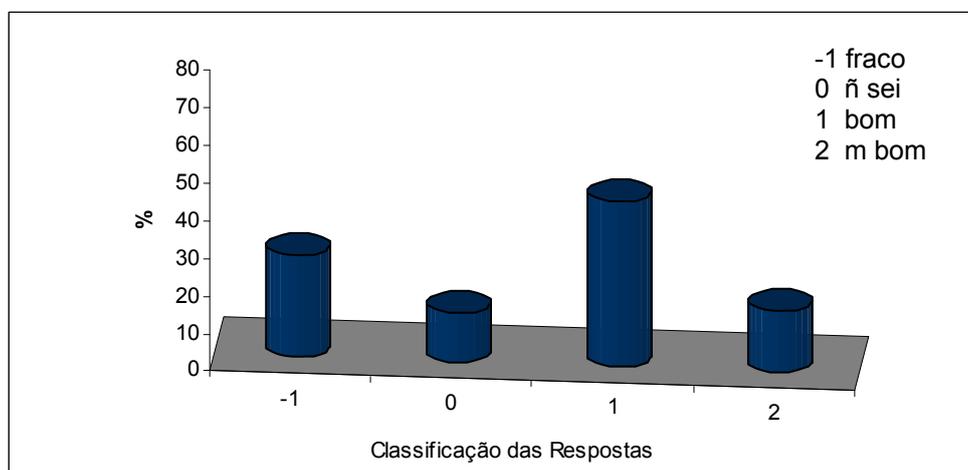
Questão 5: Sabe onde os esgotos são atualmente lançados?



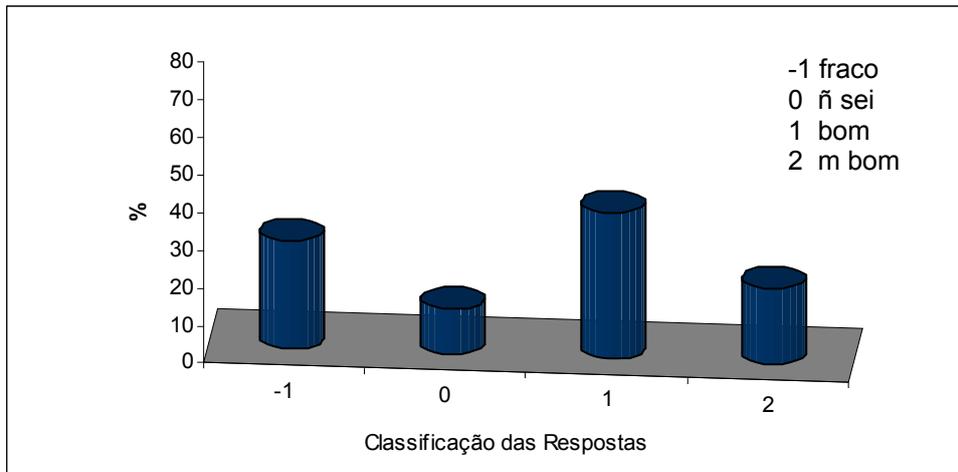
Questão 6: Qual a importância da ETE?



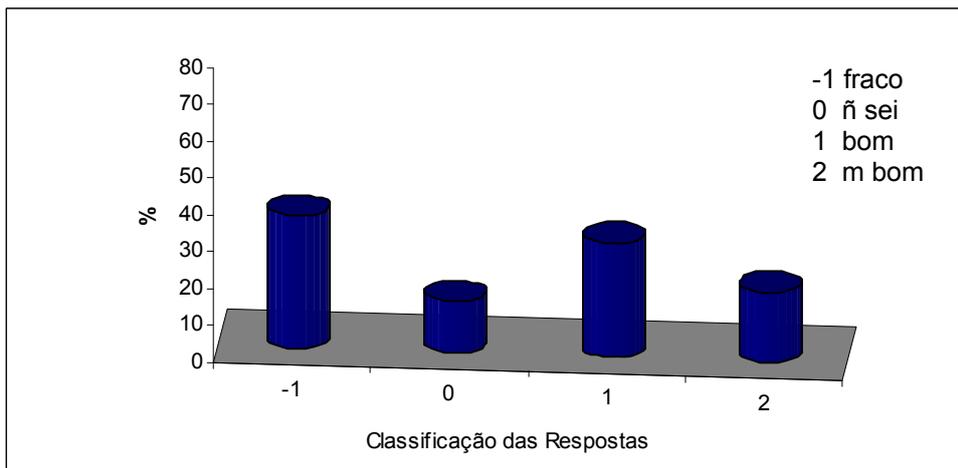
Questão 7: Motivos para comer ou não um peixe pescado no Rio do Monjolinho?



Questão 9: Problemas ambientais da cidade?



Questão 10: Comentário sobre fotografia tirada no rio do Monjolinho.



Os dados gerados são indicativos da postura da população amostral em relação aos problemas relacionados com o Rio do Monjolinho. Na análise das questões abertas deve-se atentar para diversas variantes a fim de evitar erros conceituais e/ou interpretativos. Exemplo: Nível de escolaridade do respondente. Considerando apenas quem apontou nível básico de ensino ou não assinalou este item, o somatório das respostas -1 e 0 são perceptivelmente elevados para algumas questões. Para a pergunta sobre as causas do cheiro próximo as marginais, estes valores saem de 11 % e atingem o patamar de 19,5%. Porém para algumas questões houve certa uniformidade nas respostas, talvez as fornecidas para as questões 5b e 8 tenham um significado maior para

esta análise. A primeira denota uma tendência à subestimação do interesse alheio para com o ambiente, e a segunda ao somarmos as quantidades de fármacos dispostos erroneamente no ambiente alcançamos no mínimo 52%.

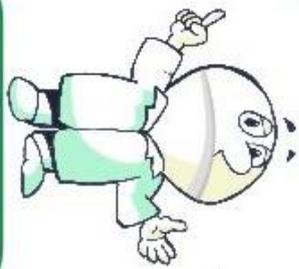
De acordo com a diretoria geral do meio ambiente dos países da Comunidade Européia (EC, 2001), iniciativas que atinjam a população com o propósito de promover a minimização de poluentes gerados através da disposição de compostos **“down the sink or the toilet”** devem ser incentivadas. Sendo que no Reino Unido e na França existem exemplos de “boas práticas ambientais” com programas de divulgação e incentivo ao retorno de medicamentos não utilizados. Exemplo este, que é recomendado a ser adotado pelos demais países membros.

Nos Estados Unidos a agência de proteção ambiental (USEPA) mantém na internet um endereço permanente sobre os produtos de uso pessoais e poluentes (<http://www.epa.gov/nerlesd1/chemistry/pharma/index.htm>), porém iniciativas presenciais ainda são pouco desenvolvidas. No estado da Califórnia na região de San Rafael existe um programa inovador onde as próprias farmácias recebem os medicamentos não usados ou vencidos e encaminham para disposição correta, usualmente incineração (On Tap, 2006).

Transportando esta questão para a realidade local do município de São Carlos, e procurando um meio de esclarecer a população sobre esta questão (considerando também as respostas obtidas na questão 8 do questionário), foi elaborada uma pequena cartilha para ser usada como instrumento educacional e de alerta sobre o descarte incorreto de fármacos (incluindo-se os hormônios).

Esta iniciativa foi apresentada em reuniões para a empresa UNIMED e para as secretárias de saúde e de desenvolvimento sustentável, ciência e tecnologia. Surgindo uma parceria entre a academia (desenvolvimento da idéia), a empresa (custos de elaboração e divulgação) e o poder público (recolhimento e destinação final). Inicialmente foram elaboradas 3,000 cópias (com previsão de segunda tiragem), as quais foram distribuídas para a população nos postos de saúde da rede municipal.

Versão final da cartilha:



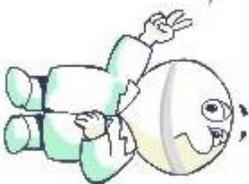
Você sabia que muitos medicamentos podem contribuir para poluir rios e lagos?

E que o efeito combinado de antibióticos, hormônios, antiinflamatórios, calmantes, analgésicos, antefamínicos etc. prejudicam os seres que vivem na água?



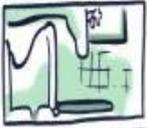
Como isto acontece?

Acontece em duas ocasiões:



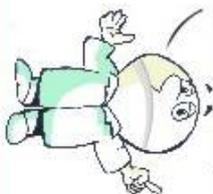
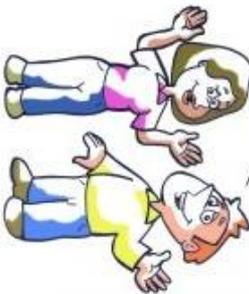
1ª. Quando os remédios são jogados fora de forma errada, como, por exemplo, quando são descartados em vasos sanitários e pias.

2ª. Quando tomamos um remédio, a parte que não foi absorvida sai do nosso corpo pela urina e fezes.



Nossa! Isto é grave!

E como podemos ajudar para que isto não ocorra?



Com certeza, pois com o passar do tempo menos filhotes irão nascer e até pode ocorrer a diminuição dos tipos de peixes em certos locais. O que provoca desequilíbrio nos ambientes aquáticos!



As medidas são simples!

- NÃO TOME MEDICAMENTO POR CONTA PRÓPRIA.
- NÃO JOGUE FORA PELA DESCARGA MEDICAMENTOS VELHOS OU NÃO USADOS.
- RETORNE OS MEDICAMENTOS QUE VOCÊ NÃO USA MAIS NOS LOCAIS INDICADOS:

Unidade Básica de Saúde
Unidade de Saúde da Família

O IMPORTANTE É QUE A ENTREGA SEJA FEITA DIRETAMENTE AO FARMACÊUTICO.

Você sabia?
Recentemente, cientistas descobriram que a reprodução dos peixes é prejudicada em locais onde há despejo de esgotos com medicamentos!

5.3 – Avaliação de Risco e Desregulação Endócrina

Em 1996, o National Research Council (NRC 1996) normalizou o emprego de dois termos (Perigo e Risco) que causavam certa confusão devido à sua aplicação conceitual equivocada. Assim, Perigo foi definido como uma ação ou fenômeno que potencialmente possa gerar dano; e Risco como a possibilidade de ocorrer um dano devido à exposição ao perigo. Algebricamente o risco pode ser expresso como o produto de duas probabilidades (NRC 2002):

$$\text{RISCO} = P(E) \times P(P/E),$$

$P(E)$ é a probabilidade de exposição,

$P(P/E)$ é a probabilidade de dano devido à exposição.

O risco sendo uma probabilidade, frequentemente é desprezado em vários setores da sociedade humana. Na questão ambiental, devido ao falso isolamento homem-natureza, este fator desencadeia graves dificuldades tanto na identificação quanto na remediação de problemas reconhecidos.

As etapas para realização de uma avaliação de risco ecológica envolvem quatro grandes passos (NRC 1994):

1) **Formulação do Problema**, o qual envolve identificação dos contaminantes, exame do movimento dos contaminantes, identificação das comunidades sob risco, e as vias de exposição;

2) **Design do Estudo**, o qual avalia as características do local;

3) **Investigação do Local**, que inclui tomada de amostras (químicas, físicas e biológicas) e realização de testes;

4) **Caracterização do risco**, que envolve uma avaliação dos riscos cumulativos e uma discussão sobre as incertezas relacionadas à estimativa do risco.

Em um excelente texto sobre gestão e avaliação de impactos e riscos desencadeados pela poluição, BRILHANTE 1999, apresenta o modelo geral do risco (Figura 45). Trata-se de um fluxograma que permite visualizar estruturalmente os processos envolvidos na análise de riscos, facilitando o dimensionamento do trabalho a ser aplicado neste tipo de abordagem.

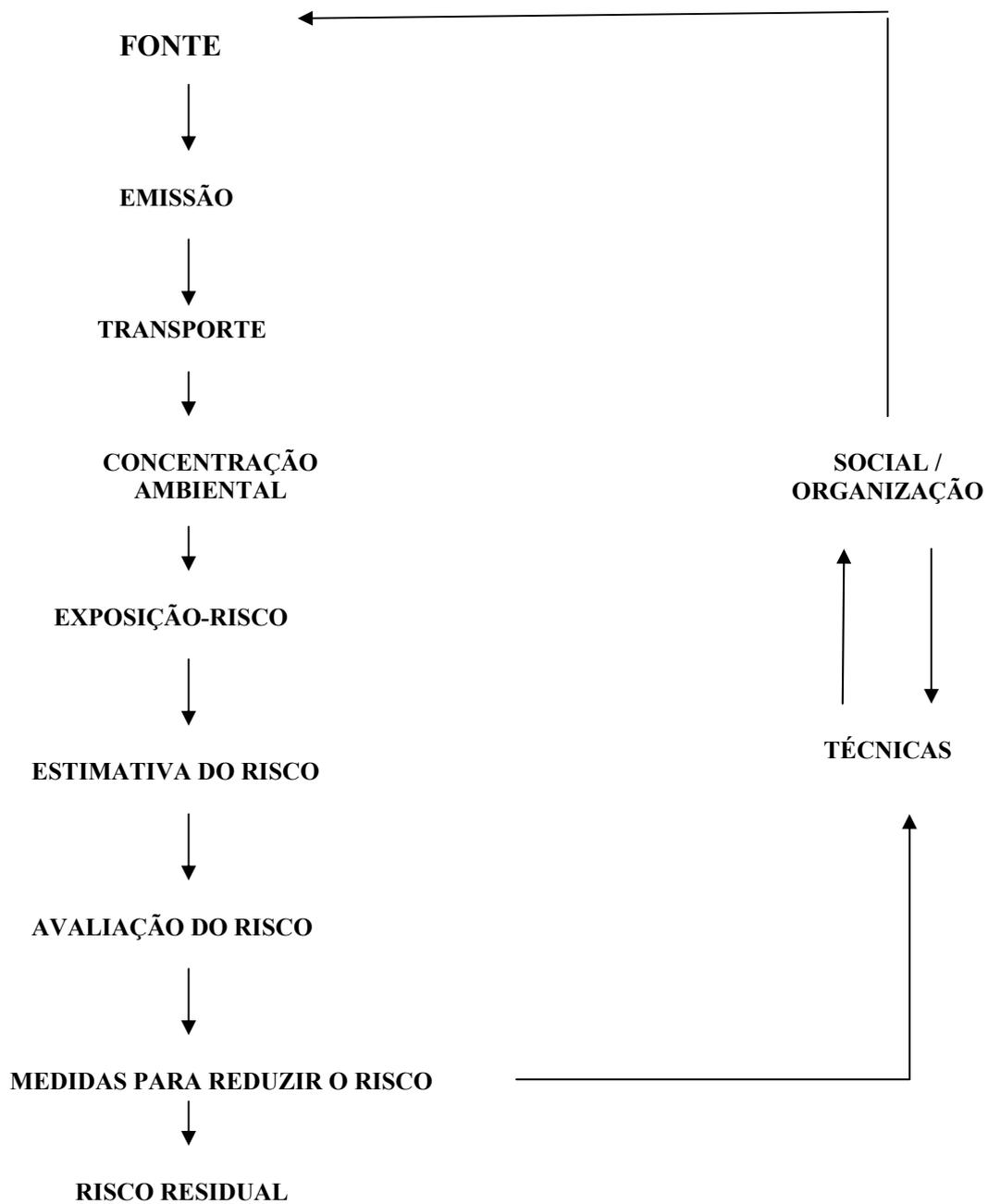


FIGURA 45 - Modelo Geral do Risco (BRILHANTE 1999).

O trabalho de BRIDGES & BRIDGES 2004, aponta como insustentáveis os procedimentos não integrativos de avaliação de risco para desreguladores endócrinos, destacando que devido à rápida expansão do número de agentes químicos com capacidade desreguladora, somente uma avaliação de risco integrada é capaz de fornecer resultados confiáveis.

Neste contexto, a avaliação de risco para os DE deve levar em consideração algumas particularidades agravantes destas classes de poluentes: 1) A não existência (nem sempre) de linearidade nas curvas dose-resposta; 2) A possibilidade de efeitos serem detectados em fases posteriores a da exposição; e 3) A transmissão e/ou manifestação dos efeitos para as gerações posteriores (MORI et al. 2003; CONOLLY & LUTZ 2004; PRAGUE WORKSHOP 2005).

Os riscos representados por estas substâncias envolvem muitos aspectos e atributos e podem ser classificados em várias dimensões (Tabela 6).

Portanto, devido à complexidade originada da interação entre múltiplos fatores, o programa internacional de segurança química (IPCS 2004) e o centro europeu para avaliação de risco de desreguladores endócrinos (EURISKED 2005) recomendam a adoção da abordagem integrativa para o delineamento da avaliação de risco relacionada aos desreguladores endócrinos.

TABELA 6 - Dimensões, divisões e características dos riscos associados aos desreguladores endócrinos (Modificado de ASSMUTH & LOUEKARI 2001)

Dimensão	Subdivisões	Interpretações/Exemplos
Causa	atribuições singularidade (única/múltipla) origem	causas e ações podem ser obscuras variadas, efeitos diretos e indiretos hormônios naturais ou sintéticos
Exposição	intencionalidade continuidade meios (compartimentos)	terapias, acidentes exposições transitórias, rápidas ou lentas ocupacional, ambiental, alimentar, etc.
Alvo	grupos de organismos níveis de atuação	Variados moléculas até populações
Conseqüência	adversidades reversibilidade	diferenças qualitativas, desregulações acentuadas ou sutis detoxificação, irreversibilidade em estágios sensíveis
Escala de Tempo	duração imediatismo passado/futuro	efeitos crônicos ou agudos, catastróficos ou não efeitos imediatos ou retardados (trans-gerações) análises retrospectivas
Escala Espacial	local / regional / global	modos de dispersão, migração das substâncias e/ou organismos
Controle	prevenção regulamentação	agentes já dispersos / novos agentes redução, banimento, veto
Benefício	nenhum / diretos / indiretos	compensações dos danos podem existir ou serem criadas
Concepção	subjetiva / objetiva	percepções, fatores psicológicos (mesmo nas medidas)

5.4 – Etapas Adotadas

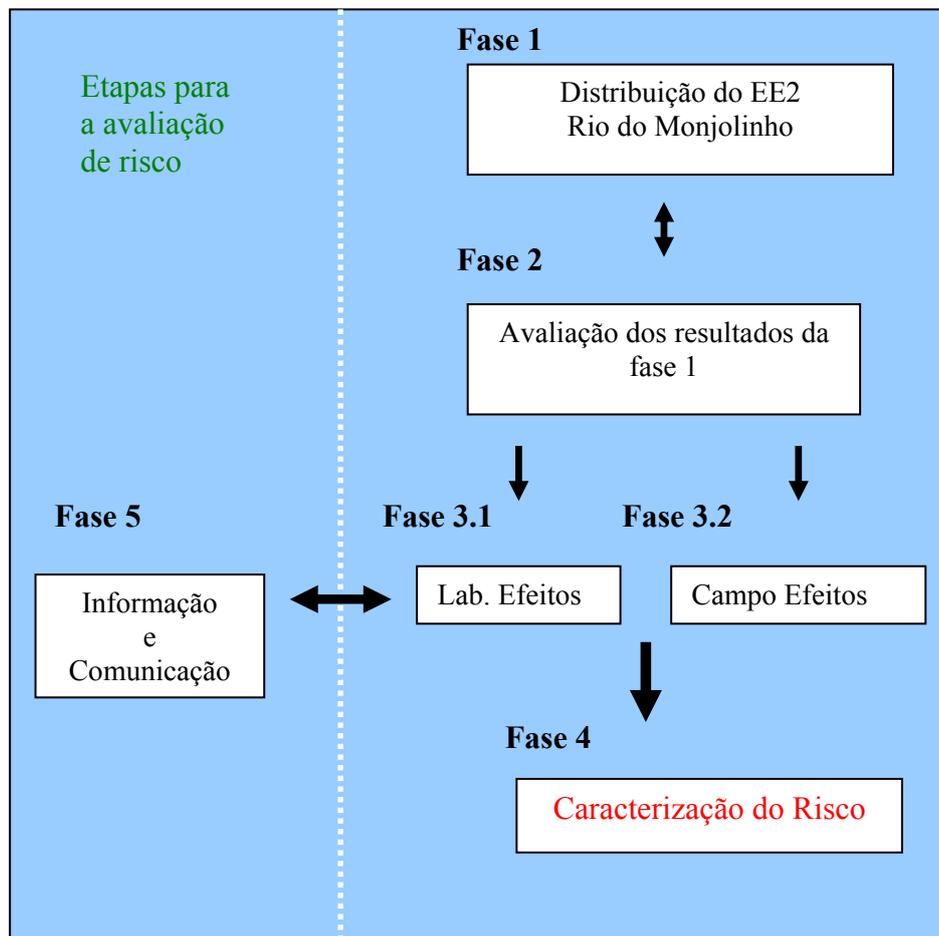


Figura 46 – Estratégia para efetuar a avaliação de risco ambiental associada à presença de estrógenos no Rio do Monjolinho

O organograma acima (Figura 46), representa a estratégia posta em prática para a avaliação do risco associado à presença de estrógenos no Rio do Monjolinho. As fases de 1 a 3 foram desenvolvidas nos capítulos anteriores e subsidiaram as fases 4 e 5. A fase 5 refere-se ao processo de comunicação de risco, e foi conduzida através da análise de percepção ambiental e confecção da cartilha informativa sobre o descarte de fármacos. A fase 4, que representa a integração de todo o trabalho e fornece a resposta que qualifica o ambiente em estudo de acordo com o grau de risco, foi executada nos moldes recomendados pelo modelo europeu (EMEA, 2005). Neste modelo, as informações são analisadas e integradas em uma probabilidade de ocorrência de efeitos (numérica) a partir de uma concentração ambiental predita (Figura

47). Assim temos a concentração ambiental predita (do inglês Predicted Environmental Concentration – PEC) e a concentração que não causa efeitos (do inglês Predicted No Effect Concentration – PNEC). O quociente PEC / PNEC fornece uma estimativa do risco ambiental da área avaliada (WALKER et al. 2007).

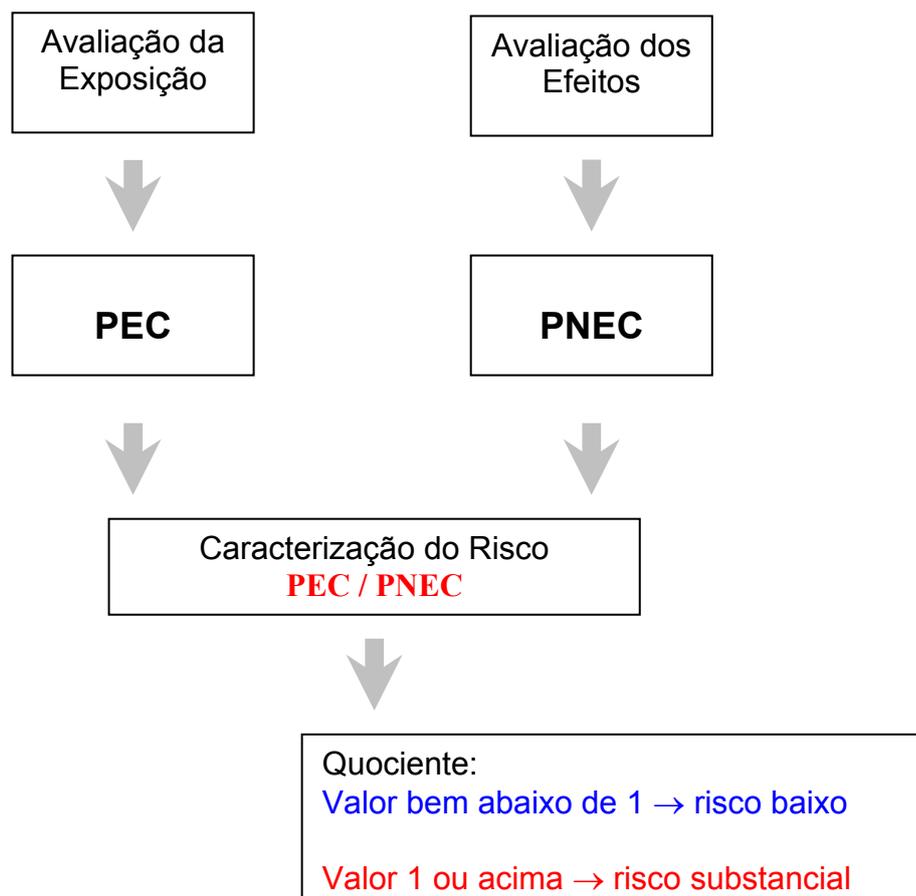


Figura 47 – Esquema simplificado de uma avaliação de risco ambiental.

Para fármacos onde PEC seja inferior a $0,01 \mu\text{g.L}^{-1}$ e não houver algum atributo que cause preocupação é assumido que o produto não representa risco para o ambiente e a avaliação de risco é cessada. Porém para ED o risco deve ser avaliado independentemente da quantidade disposta para o ambiente (EMEA, op.cit.). Principalmente devido a suas ações sobre os eixos hormonais e conseqüentes inúmeros distúrbios desencadeados (MANAHAN 2003, FALCONER et al. 2006), incidência de efeitos em razão da interação de compostos em pequenas doses (KORTENKAMP 2007), além dos estrógenos serem reconhecidamente substâncias carcinogênicas (NELSON 2002).

5.4.1 – Modelo e Análise

A avaliação da carga de estrógenos disponibilizada por uma cidade de porte médio como São Carlos (~ 250.000 habitantes) foi computada a partir de um modelo fundamentado em dados estatísticos populacionais propostos por JOHNSON & WILLIAMS 2004. Este modelo permite estimar quantidades de hormônios diariamente excretados por uma determinada população, se ajustando as faixas etárias que a compõe.

A excreção per capita média, assim como o montante populacional, para os hormônios naturais estrona (E1), estradiol (E2) e o sintético etinilestradiol (EE2) são sumariadas na tabela 5b. Sendo na tabela 5c mostradas as quantidades dispostas para o ambiente (Rio do Monjolinho). A vazão média de esgotos lançados para o rio e utilizada nos cálculos foi de 54864 m³.dia⁻¹ (Prof. Luiz Daniel comunicação pessoal). Para efeito de comparação, também foram utilizadas as taxas de remoção média para estrógenos, obtidas de DE MES et al. 2004 em ampla avaliação feita sobre estudos realizados em várias estações de tratamento ao redor do mundo, considerando ainda distintas estações climáticas.

Tabela 7 - Quantidade média de estrógenos naturais (E2 e E1) e sintéticos (EE2) diariamente excretados

Estrógeno	Excreção (µg.dia⁻¹)	Excreção Σ população (µg.dia⁻¹)
17 β-Estradiol (E2)	3,3	825.000
Estrona (E1)	13,8	3.450.000
17 α-Etinilestradiol (EE2)	0,89	222.500
Carga Total		4.497.500

Tabela 8 - Concentração de estrógenos disponibilizada para o ambiente. Caso1: Não existência de tratamento. Caso 2: Quantidades após remoção em ETE.

Estrógeno (ng.L⁻¹)	Caso 1*	Caso 2**
17 β-Estradiol (E2)	15,03	3,31
Estrona (E1)	62,88	25,15
17 α-Etinilestradiol (EE2)	4,06	1,99

*Concentração obtida pela razão entre a quantidade populacional excretada em µg.dia⁻¹ e a vazão média considerada 54864 m³.dia⁻¹.

** Taxas médias de remoção (E2 78%, E1 60% , EE2 49%) obtidas de DE MES et al. 2004.

A Figura 48 representa a carga poluidora predita total de hormônios estrogênicos chegando diariamente no corpo hídrico receptor.

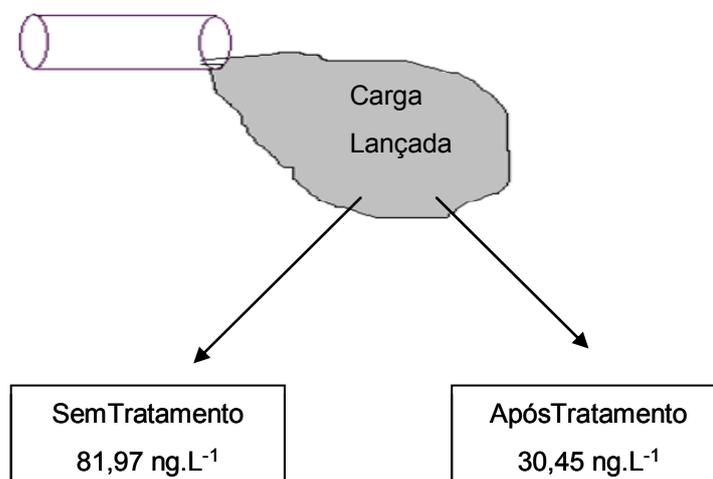


Figura 48 – Representação hipotética da carga poluidora total de compostos estrogênicos imposta diariamente ao Rio do Monjolinho. Baseada em modelo explicado no texto.

Considerando-se apenas a concentração do fármaco sintético anticoncepcional EE2 e aplicando a razão PEC/PNEC, temos para o Caso1 (quantidade lançada diariamente no Rio do Monjolinho) um PEC previsto de 4,06 ng.L⁻¹ e um PNEC (obtido dos ensaios com *C.silvestrii*, Capítulo 4) de 2,75 ng.L⁻¹. Assim:

$$\text{RISCO EE2} = \text{PEC} / \text{PNEC}$$

$$\text{RISCO EE2} = 4,06 / 2,75 = \mathbf{1,48} \text{ situação de risco.}$$

Aplicando a razão para a concentração máxima de EE2 determinada no Rio do Monjolinho (Capítulo 2), obtemos o risco cumulativo em relação ao tempo:

$$\text{RISCO EE2} = 33,51 / 2,75 = \mathbf{12,19} \text{ situação de risco acentuado.}$$

Porém ao adotar o PNEC de 0,1 ng.L⁻¹ como recomendado pela agência ambiental britânica (YONG et al., 2004), teremos situações onde a classificação de risco para o Rio do Monjolinho será extremamente alta, pois como já mencionado a partir de 1 o risco já é considerado substancial. Sendo os valores de **40,6** para o modelo de carga diária, e de **335,1** para a concentração determinada no próprio rio. Comprovando deste modo, que a

biota existente no Rio do Monjolinho está submetida a concentrações deletérias de EE2.

Este panorama se torna ainda mais temerário ao examinarmos a Figura 48 e ponderarmos sobre a carga total que é lançada ao rio em função das misturas dos hormônios, pois os efeitos podem ser potencializados pelas interações entre os compostos estrogênicos. Ainda cabe ressaltar que efluentes são misturas complexas onde centenas de outras classes de substâncias encontram-se presentes, sendo a diminuição da carga tóxica de soluções com composição tão numerosa um grande desafio a ser vencido (USEPA 1999, WARNE 2003, SUÁREZ et al. 2008).

Além da biota existente no rio, a população humana é exposta a estes compostos quando interage diretamente no ambiente, no caso de contato primário e pesca; embora estas ocorrências sejam esporádicas e representem à ação recorrente de poucos indivíduos. Porém o risco maior reside na interação entre bacias, ou seja, no decurso do processo de lançamento de esgotos e captação de água para consumo. Conforme expressa CAMPOS 2000, esgotos de cidades a montante atingem direta ou indiretamente o abastecimento de água das cidades a jusante. Assim, se as estações de tratamento de águas (ETA) não possuem sistemas adequados (avançados) de eliminação destas substâncias (TERNES et al 2002, LORAINE & PETTIGROVE 2006), resíduos podem alcançar os habitantes via torneira (“tap water”).

Registros de EE2 em água de consumo são esparsos, em um abrangente estudo realizado para o instituto de ecologia aplicada e biologia molecular da Alemanha (IME) WENZEL et al. 2003, reportam que a concentração máxima de EE2 encontrada na Europa em águas de abastecimento foi de 1,4 ng.L⁻¹. Os autores desse relatório expõe cálculos úteis para uma avaliação de risco, onde o nível diário de exposição pelo consumo de água seria de 0,047 EE2 ng.kg⁻¹ para adultos (60 kg) é de 0,21 EE2 ng.kg⁻¹ para bebês (5 kg). Os autores frisam que a relevância fisiológica destes dados é incerta, embora concluem que os estrógenos naturais e sintéticos sejam os mais potentes desreguladores endócrinos conhecidos e, portanto passíveis de regulação quanto à presença em água indicada para consumo. No Brasil, até o presente momento, não existe publicação científica relatando ocorrência de

EE2 em águas de abastecimento. Todavia, trabalhos começam a ser desenvolvidas por grupos de pesquisa em distintas universidades. GHISELLI 2006, em sua tese de doutoramento encontrou concentração bastante elevada desse hormônio sintético na água destinada para suprir a população da região de Campinas-SP (Concentração em água potável entre 1,6 -1,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Esses valores, atípicos na literatura científica mundial, representam uma exposição diária considerável para adultos e bebês de 0,056 EE2 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e 0,255 EE2 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ respectivamente, servindo desse modo de alerta para os demais municípios do estado.

Dentro deste quadro, pode-se afirmar que o Rio do Monjolinho é afetado diariamente pelo despejo de esgotos e, por conseguinte pelos DE entre estes o potente etinilestradiol (EE2) em elevada concentração. Conclui-se que a biota residente no rio é sujeita aos graves efeitos desreguladores destes compostos, sendo que a população humana também não está isenta de riscos, ainda que secundários, em razão do contato e/ou consumo de água contaminada.

Como o município de São Carlos esta na iminência de inaugurar a ETE do Monjolinho, será de crucial importância à avaliação da eficiência das tecnologias de tratamento a serem empregadas frente a estes problemáticos contaminantes emergentes.

5.5 – REFERÊNCIAS

ASSMUTH, T.; LOUEKARI, K. 2001. Research for Management of Environmental Risks for Endocrine Disrupters. Editora Ab. 221p.

BIKSEY, T.M. & BERNHARDT, A.M. 2000. The right tool for the job. Water Environment & Technology, 7: 30-35.

BRIDGE, J.W. & BRIDGES, O. 2004. Integrated risk assessment and endocrine disrupters. Toxicology, 205: 11-15.

BRILHANTE, O.M. 1999. Gestão e Avaliação da Poluição, Impacto e Risco na Saúde Ambiental. In: BRILHANTE, O.M. & CALDAS, L.Q. de A. coord. Gestão e Avaliação de Risco em Saúde Ambiental. Editora Fiocruz. pp. 19-73.

CAMPOS, J.R. 2000. O Saneamento Básico no Brasil. In: CASTELLANO, E.G. & CHAUDHRY, F.H. (eds.). Desenvolvimento Sustentado: Problemas e Estratégias. EESC-USP. pp. 7-24.

CONOLLY, R.B. & LUTZ, W.K. 2004. Nonmonotonic dose-response relationships: Mechanistic basis, kinetic modeling, and implications for risk assessment. *Toxicological Sciences*, 77: 151-157.

DE MES, T., ZEEMAN, G., LETTINGA, G. 2005. Occurrence and fate of estrone, 17 β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol in STPs for domestic wastewater. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 4: 275-311.

EC (European Commission). 2001. Pollutants in Urban Waste Water and Sewage Sludge. Final Report. 273 p. Disponível em: <http://europa.eu.int/comm/environment/pubs/home.htm>

EMA (European Medicines Agency). 2005. Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use. 21p.

EURISKED ((Multi-Organic Risk Assessment of Selected Endocrine Disrupters). 2005. Risk Assessment Scheme for Endocrine Disrupters Chemicals. Disponível em: <http://www.eurisked.org> , acessada em Junho de 2005.

FALCONER, I.R., CHAPMAN, H.F., MOORE, M.R., RANMUTHUGALA, G. 2006. Endocrine-Disrupting compounds: A review of their challenge to sustainable and safe water supply and water reuse. *Environ. Toxicol.*, 21: 181-191.

GHISELLI, G. 2006. Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: Ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de Higiene Pessoal (PFHP). Universidade de Campinas (UNICAMP), (Tese). 181p.

GRASMÜK, D. & SCHOLZ, R.W. 2005. Risk perception of heavy metal soil contamination by high – exposed and low – exposed inhabitants: The role of knowledge and emotional concerns. *Risk Analysis*, 25 (3): 611-622.

IPCS (International Programme on Chemical Safety). 2004. A Framework for the Integration of Health and Ecological Risks. Disponível em: http://www.who.int/pcs/emerg_site/integr_ra/ira_report.htm , acessada em Abril de 2005.

JOHNSON, A.C. & WILLIAMS, R.J. 2004. A model to estimate influent and effluent concentrations of estradiol, estrone, and ethynylestradiol at sewage treatment works. *Environ. Sci. Technol.*, 38: 3649-3658.

KORTENKAMP, A. 2007. Ten years of mixing cocktails: A review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environ. Health. Perspect.*, 115: 98-105.

LORAINÉ, G.A. & PETTIGROVE, M.E. 2006. Seasonal variations in concentrations of pharmaceuticals and personal care products in drinking water

and reclaimed wastewater in southern California. *Environ. Sci. Technol.*, 40: 687-695.

MANAHAN, S.E. 2003. *Toxicological Chemistry and Biochemistry*. CRC Press. 425p.

MORI, C.; KOMIYAMA, M.; ADACHI, T.; SAKURAI, K.; NISHIMURA, D.; TAKASHIMA, K.; TOKADA, E. 2003. Application of toxicogenomic analysis to risk assessment of delayed long-term effects of multiple chemicals, including endocrine disruptors in human fetuses. *Environ. Health. Perspect.*, 111: 803-809.

NELSON, R. 2002. Steroidal oestrogens added to list of known human carcinogens. *The Lancet*, 360: 2053.

NRC (National Research Council). 1994. *Science and Judgment in Risk Assessment*. National Academic Press. 672p.

NRC (National Research Council). 1996. *Understanding Risk: Informing Decisions in a Democratic Society*. National Academic Press. 236p.

NRC (National Research Council). 2002. *Animal Biotechnology: Science Based Concerns*. National Academic Press. 201p.

ON TAP MAGAZINE (National Environment Services Center). 2006. Flushing drugs wastes money, pollutes water. Volume 6 (1): 10-11.

PRAGUE WORKSHOP. 2005. The Prague Declaration on Endocrine Disruption. Prague 10 – 12 May 2005. Disponível em: <http://www.ehponline.org/docs/>, acessada em Maio de 2006.

SUÁREZ, S., CARBALLA, M., OMIL, F., LEMA, J.M. 2008. How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters? *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 7: 125-138.

TERNES, T.A., MEISENHEIMER, M., MCDOWELL, D., SACHER, F., BRAUCH, H-J., HAIST-GULDE, B., PREUSS, G., WILME, U., ZULEI-SEIBERT, N. 2002. Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. *Environ. Sci. Technol.*, 36: 3855-3863.

TRAN, K.C., EUAN, J., ISLA, M.L.. 2002. Public perception of development issues: Impact of water pollution on a small coastal community. *Ocean & Coastal Management* 45: 405-420.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). 1999. *Toxicity Reduction Evaluation Guidance for Municipal Wastewater Treatment Plants*. 83p.

WALKER, C.H., HOPKIN, S.P., SIBLY, R.M., PEAKALL, D.B. 2007. Toxicity Testing. In: WALKER, C.H., HOPKIN, S.P., SIBLY, R.M., PEAKALL, D.B. Principles of Ecotoxicology. Taylor & Francis. pp. 87-108.

WARNE, M. St J. 2003. A Review of the Ecotoxicity of Mixtures, Approaches to, and Recommendations for, their Management. In: LANGLEY, A., GILBEY, M., KENNEDY, B. (eds.). Proceedings of the Fifth National Workshop on the Assessment of Site Contamination (Adelaide, Australia). EPHC. pp. 253-276.

WENZEL, A., MÜLLER, J., TERNES, T. 2003. Study on Endocrine Disrupters in Drinking Water. Final Report. 152p.

WHITE, M.J. & HUNTER, L.M. 2005. Public Perception of Environmental Issues in a Development Setting. IBS (Institute of Behavioral Science) Working Paper EB2005-0003. 48p.

WILLIS, H.H., DEKAY, M.L., FISCHHOFF, B., MORGAN, M.G. 2005. Aggregate, disaggregate, and hybrid analyses of ecological risk perceptions. Risk Analysis, 25 (2): 405-428.

YONG, W.F., WHITEHOUSE, P., JOHNSON, I., SOROKIN, N. 2004. Proposed Predicted-No-Effect-Concentrations (PNECs) for Natural and Synthetic Steroid Oestrogens in Surface Waters. UK Environmental Agency, Technical Report P2-T04/1. 172p.

CONCLUSÕES & RECOMENDAÇÕES

➔ As suposições de ocorrência de substâncias estrogênicas nas águas do Rio do Monjolinho se confirmaram. Embora as técnicas analíticas disponíveis não fossem as mais avançadas, foi possível averiguar a existência de concentrações do hormônio natural estradiol (E2) e principalmente do sintético etinilestradiol (EE2) em distintos períodos amostrais. A aplicação de técnicas mais refinadas de análise química de futuras amostras, através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrofotômetro de massas em seqüência (LC-MS-MS) é altamente recomendável para detecção de possíveis outras substâncias, essencialmente pela capacidade de detecção de concentrações ínfimas, que coexistam contaminando o meio.

➔ A aplicação de técnicas de biologia molecular para a detecção de efeitos sobre organismos, é um campo de interesse prioritário. A toxicogenômica ambiental, como é denominada, é fundamental para obtenção de respostas com peso de evidência em análises ambientais. A incidência da proteína vitelogenina (VTG) ou do ácido ribonucléico mensageiro (Vtg mRNA), em vários exemplares de peixes machos capturados no Rio do Monjolinho constitui prova irrefutável da existência de desregulação endócrina afetando a biota aquática. A ratificação da seqüência nucleotídica da molécula de Vtg mRNA existente em outras espécies de tilápias para a espécie de tilápia que é abundante em rios do Brasil (*Oreochromis niloticus*) foi uma etapa de grande importância neste estudo. Este biomarcador de exposição/efeito possibilita que vários outros trabalhos sejam desenvolvidos utilizando uma espécie resistente e completamente integrada aos ecossistemas lóticos e lênticos nacionais.

➔ Condições desbalanceadas do meio vivente refletem na bioquímica metabólica dos organismos sujeitos as alterações impostas. A aplicação de ensaios ELISA (imunoensaios) é um modo eficiente e rápido de detecção específica de anormalidades. A comparação de respostas entre uma espécie internacionalmente reconhecida (*Danio rerio*) e uma espécie nativa (*Hyphessobrycon eques*) quando submetidas à concentração ambientalmente

relevante de EE2 e determinadas por um teste padronizado para a primeira, indicou semelhanças entre as moléculas da VTG para as espécies. Devido à praticidade de manutenção destes pequenos peixes em laboratório, *H. eques* pode ser empregado, ao menos, para levantamentos semi-quantitativos de estrogenicidade em águas e efluentes; conferindo relevância ecológica aos estudos desenvolvidos. Porém é recomendado que estudos venham a ser direcionados para purificação de proteínas Vtg desta e de outras espécies nativas para aprimoramento das respostas obtidas neste estudo

➔ Interferências sutis nas intrincadas relações que regem as espécies, são um campo fascinante de exploração dentro da ecotoxicologia. Devido à existência de “variáveis escondidas” traduzidas pelo conceito de propriedades emergentes, efeitos inesperados podem surgir a partir de fatos considerados, pelo olhar antropocêntrico, sem conexão. Neste contexto a alteração comportamental induzida pelo hormônio EE2 sobre *Ceriodaphnia silvestrii*, modificando seu padrão natatório permitiu que um dos seus predadores, *Chaoborus sp*, tivesse sucesso maior em suas investidas. As utilizações deste tipo de abordagem em estudos ecotoxicológicos acrescentam um nível de conhecimento necessário na tentativa incessante de discernir os mecanismos complexos existentes nas teias tróficas. Assim a identificação destas perturbações, emana um grau superior de preocupação, vinculando a desregulação endócrina como poluentes interferentes nas relações interespecíficas.

➔ Riscos ambientais são muitas das vezes nebulosos. Este caráter enigmático é creditado aos inúmeros fatores interagentes que resultam em um volume denso de informações e de difícil asserção nexocausal. Particularmente aos hormônios estrogênicos, e em maior consideração ao EE2, não existe objeção de que sua presença no meio ambiente é passível de desencadear efeitos danosos aos mais variados taxa, inclusive causando instabilidade nos sistemas ecológicos. Conforme evidenciado neste estudo, o risco sócio-ambiental devido às quantidades de EE2 encontradas no Rio do Monjolinho é expressivo. Embora para a população humana não existam dados palpáveis, rege recorrer ao princípio da precaução, onde a falta de certezas não é motivo para a falta de

ações preventivas. Assim, considerando que o município está na iminência de inaugurar a ETE do Monjolinho, é primordial a continuidade de pesquisas com o objetivo de avaliar a presença e riscos associados aos DE, nas distintas etapas, e efluente final da estação de tratamento. Também avaliações em ETA e novas abordagens ecotoxicológicas são recomendadas para gerarem dados que permitam assegurar um ambiente sadio.

“... É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê...”

Los Hermanos