

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**Uso de bioindicador de efeito endócrino e validação do método para
determinação de hormônios na água da Represa Municipal de São José do Rio
Preto, SP.**

Aluna: Daniela Cordeiro

Orientadora: Prof^a. Dra. Eny Maria Vieira

Outubro de 2009

Daniela Cordeiro

**Uso de bioindicador de efeito endócrino e validação do método para
determinação de hormônios na água da Represa Municipal de São José do Rio
Preto, SP.**

Dissertação apresentada ao
Instituto de Química de São
Carlos, da Universidade de
São Paulo como quesito para
obtenção do título de Mestre
em Química Analítica.

Orientadora: Prof^a. Dra. Eny Maria Vieira

São Carlos
2009

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo.

À Profa. Dra. Eny Maria Vieira pela orientação, amor e carinho.

À minha família (Natalicio, Glacélia, Natália e Elba) e meu namorado (Leandro) pelo amor e apoio nos momentos em que precisei.

Ao Prof. Dr. Vitor Hugo Polisél Pacces pela orientação na validação, atenção e paciência.

Ao meu amigo Guilherme Casoni da Rocha pela amizade, por me ajudar a validar os hormônios estudados e fazer as análises de VTG por ELISA.

Ao Dr. Eduardo Makoto Onaka do Instituto de Pesca por me ajudar a capturar, anestesiá-lo e coletar o sangue dos peixes na Represa Municipal de São José do Rio Preto (SP).

À Polícia Ambiental de São José do Rio Preto (SP) por me ajudar a capturar os peixes na Represa Municipal.

Ao Prof. Dr. Eduardo Bessa Azevedo por me ajudar com a dissertação.

À minha amiga Luciana Teresa Dias Cappelini pela amizade e por me ajudar quando precisei.

Ao Paulo e Mauro funcionários do CAQI pela ajuda.

À Eliana Cordeiro por me ajudar com a bibliografia.

Ao pessoal do laboratório (Daniel, Eliane e Gustavo) pela amizade.

Ao Instituto de Química de São Carlos pelo apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

RESUMO

Dentre os vários xenobióticos que as atividades humanas têm produzido nas últimas décadas, os desreguladores endócrinos (EDs), incluindo os hormônios, vêm chamando a atenção de pesquisadores devido aos efeitos que eles causam em animais. Esses efeitos podem resultar em características hermafroditas nos peixes e em anfíbios, inibição do crescimento testicular, inibição da espermatogênese, decréscimo da capacidade de fertilização dos ovos e alteração no comportamento reprodutivo dos seres vivos. Concentrações de apenas 10 ng L^{-1} de hormônio no meio aquático já são capazes de causar efeito endócrino nos organismos. Neste estudo determinou-se o hormônio natural 17β -estradiol e os hormônios sintéticos levonorgestrel e 17α -etinilestradiol na água da Represa Municipal de São José do Rio Preto (SP). A primeira etapa deste estudo foi a validação dos métodos segundo a Resolução-RE 899 da ANVISA. Os limites de detecção, de quantificação e inferior de quantificação do método para a determinação do 17α -etinilestradiol foram, respectivamente, 25, 100 e 100 ng L^{-1} . A linearidade, desvio-padrão relativo, exatidão e recuperação média para o 17α -etinilestradiol foram, respectivamente, R de 0,98, 3,23%, 100,53% e 89,95%. Os limites de detecção, de quantificação e inferior de quantificação do método para a determinação do 17β -estradiol foram, respectivamente, de 100, 150 e 150 ng L^{-1} . A linearidade, desvio-padrão relativo, exatidão e recuperação média do 17β -estradiol foram, respectivamente, R de 0,99, 3,43%, 106,16% e 89,05%. Para o levonorgestrel, os limites de detecção, de quantificação e inferior de quantificação foram, respectivamente, 50, 150 e 150 ng L^{-1} . A linearidade, desvio-padrão relativo, exatidão e recuperação média do método para a determinação do levonorgestrel foi respectivamente, R de 0,98, 3,48%, 105,15% e 86,45%. Na segunda etapa desta pesquisa analisaram-se amostras de água coletadas na Represa Municipal de São José do Rio Preto (SP) quanto à presença de hormônios. Como método de extração dos hormônios, usou-se a SPE e, como técnica analítica HPLC/FLU/DAD. Os resultados não indicaram a presença dos hormônios estudados até o limite de detecção do método empregado. Foi feita também a análise de vitelogenina (VTG) em plasma sanguíneo de peixes das espécies *Geophagus brasiliensis* (cará), *Satanoperca pappaterra* (zoiúdo) e *Tilapia rendalli* (tilápia rendali) capturados na referida represa. Observou-se que os peixes machos continham concentração de VTG na faixa de 152,4 a $2.841,8 \text{ ng mL}^{-1}$. Isto indica que há substâncias de efeito endócrino na água da represa, mas não se pode afirmar que sejam os hormônios estudados.

Palavras-chaves: Hormônio, 17α -etinilestradiol, 17β -estradiol, levonorgestrel, VTG, ELISA.

ABSTRACT

Among the several xenobiotics that human activities have produced in the last decades, endocrine disruptors (EDs), including hormones, have been drawing the attention of researches due to the effects they can cause in animals. Those effects may result in hermaphrodite characteristics in fishes and amphibians, testicular growth inhibition, spermatogenesis inhibition, eggs fertilization capacity decrease, and changes in the reproductive behavior of living beings. Concentrations of only 10 ng L⁻¹ of hormones in the aquatic medium are capable of causing endocrine effects in organisms. In this study, the natural hormone 17 β -estradiol and the synthetic ones levonorgestrel and 17 α -ethinylestradiol were determined in the waters of the São José do Rio Preto (SP) dam. The first step of this study was the validation of the methods according to ANVISA's Resolution 899. The detection, quantification, and lower quantification limits of the method for determining 17 α -ethinylestradiol were, respectively, 25, 100, and 100 ng L⁻¹. The linearity, relative standard deviation, accuracy, and average recovery of the method for determining 17 α -ethinylestradiol were, respectively, R equal to 0.98, 3.23%, 100.53%, and 89.95%. The detection, quantification, and lower quantification limits of the method for determining 17 β -estradiol were, respectively, 100, 150, and 150 ng L⁻¹. The linearity, relative standard deviation, accuracy, and average recovery of the method for determining 17 β -estradiol were, respectively, R equal to 0.99, 3.43%, 106.16%, and 89.05%. For levonorgestrel, the detection, quantification, and lower quantification limits of the method were, respectively, 50, 150, and 150 ng L⁻¹. The linearity, relative standard deviation, accuracy, and average recovery of the method for determining levonorgestrel were, respectively, R equal to 0.98, 3.48%, 105.15%, and 86.45%. In the second step of this research, samples collected in the São José do Rio Preto (SP) dam were analyzed regarding the presence of hormones. For extracting the hormones, SPE cartridges were used followed by HPLC/FLU/DAD. The results indicated the absence of the studied hormones down to the detection limits of the methods employed. Vitellogenin (VTG) analyses were performed in the blood plasma of fishes captured in the beforementioned dam, of the species *Geophagus brasiliensis* (pearl cichlid or pearl eartheater), *Satanoperca pappaterra* (Pantanal eartheater or Paraguay River eartheater), and *Tilapia rendalli* (redbreast tilapia). It was observed that male fishes had VTG concentrations between 152.4 and 2,841.8 ng mL⁻¹. That indicates that there are substances with endocrine effect in the dam water, although one cannot say the studied hormones are among them.

Keywords: Hormone, 17 α -ethinylestradiol, 17 β -estradiol, levonorgestrel, VTG, ELISA.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Representação das possíveis fontes de contaminação por EDs..... | 24 |
| Figura 2. Estrutura dos estrógenos a serem estudados | 25 |
| Figura 3. Foto de satélite da Represa Municipal de São José do Rio Preto..... | 31 |
| Figura 4. Ponto 1 – Ponto de coleta de água para abastecimento da população. | 36 |
| Figura 5. Ponto 2 – Lançamento de esgoto..... | 37 |
| Figura 6. Ponto 3 – Lançamento de esgoto..... | 37 |
| Figura 7. Ponto 4 – Lançamento de esgoto..... | 38 |
| Figura 8. Ponto 5 – Lançamento de esgoto..... | 38 |
| Figura 9. Ponto 6 – Ponto de coleta de água para abastecimento da população | 39 |
| Figura 10. Cará (<i>Geophagus brasiliensis</i>) capturado na Represa Municipal de São José do Rio Preto..... | 41 |
| Figura 11. Tilápia rendada (<i>Tilapia rendalli</i>) capturada na Represa Municipal de São José do Rio Preto..... | 41 |
| Figura 12. Zoiúdo (<i>Satanoperca papaterra</i>) capturado na Represa Municipal de São José do Rio Preto..... | 42 |
| Figura 13. Espectro de UV do levonorgestrel..... | 44 |
| Figura 14. Espectro de UV do 17 α -etinilestradiol. | 45 |
| Figura 15. Espectro de excitação do 17 α -etinilestradiol obtido no fluorímetro. | 45 |
| Figura 16. Espectro de emissão do 17 α -etinilestradiol obtido no fluorímetro. | 46 |
| Figura 17. Espectro de UV do 17 β -estradiol..... | 47 |
| Figura 18. Espectro de excitação do 17 β -estradiol obtido no fluorímetro..... | 47 |
| Figura 19. Espectro de emissão do 17 β -estradiol obtido no fluorímetro. | 48 |
| Figura 20. Espectro de comparação para fase móvel para 17 β -estradiol. | 49 |
| Figura 21. Espectro de comparação entre 230 e 280nm no HPLC/FLU para 17 β -estradiol..... | 49 |
| Figura 22. Cromatograma do levonorgestrel na concentração de 2,5 μ gL ⁻¹ , método Araújo (2006)..... | 51 |

| | |
|---|----|
| Figura 23. Cromatograma do levonorgestrel na concentração de $2,5\mu\text{gL}^{-1}$, método Lopes (2007). | 51 |
| Figura 24. Cromatograma de 100mL para a concentração de $0,15\mu\text{gL}^{-1}$ de levonorgestrel, extraída por SPE pelo método Lopes (2007). | 52 |
| Figura 25. Cromatograma de 200mL para a concentração de $0,15\mu\text{gL}^{-1}$ de levonorgestrel, extraída por SPE pelo método Lopes (2007). | 53 |
| Figura 26. Seletividade do método para a análise do 17α -etinilestradiol (tempo de retenção de 8,19 min). | 54 |
| Figura 27. Seletividade do método para a análise do 17β -estradiol (tempo de retenção de 4,59 min). | 55 |
| Figura 28. Seletividade do método para o levonorgestrel (tempo de retenção de 17,41 min). | 56 |
| Figura 29. Linearidade do método para a análise do 17α -etinilestradiol na concentração de $0,10$ a $1,0\mu\text{gL}^{-1}$. | 58 |
| Figura 30. Linearidade do método para a análise do 17α -etinilestradiol na concentração de $1,0$ a $10,0\mu\text{gL}^{-1}$. | 59 |
| Figura 31. Linearidade do método para a análise do 17α -etinilestradiol na concentração de $10,0$ a $50,0\mu\text{gL}^{-1}$. | 59 |
| Figura 32. Linearidade do método para a análise do 17β -estradiol na concentração de $0,15$ a $5,0\mu\text{gL}^{-1}$. | 60 |
| Figura 33. Linearidade do método para a análise do 17β -estradiol na concentração de $5,0$ a $42\mu\text{gL}^{-1}$. | 60 |
| Figura 34. Linearidade do método para a análise do levonorgestrel na concentração de $0,15$ a $10,0\mu\text{gL}^{-1}$. | 61 |
| Figura 35. Linearidade do método para a análise do levonorgestrel na concentração de $10,0$ a $360,0\mu\text{gL}^{-1}$. | 61 |
| Figura 36. Temperatura média do mês de Janeiro de 2009. | 68 |
| Figura 37. Temperatura média do mês de Março de 2009. | 68 |
| Figura 38. Temperatura média do mês de Maio de 2009. | 69 |
| Figura 39. Temperatura média do mês de Julho de 2009. | 69 |
| Figura 40. Amostra de água da coleta de março fortificada com 17α -etinilestradiol. | 72 |
| Figura 41. Amostra de água da coleta de março fortificada com 17β -estradiol. | 72 |
| Figura 42. Amostra de água da coleta de março fortificada com levonorgestrel. | 73 |

| | |
|--|----|
| Figura 43. Linearidade das concentrações de VTG. | 74 |
| Figura 44. Concentração de VTG encontrada nas amostras de peixes machos capturados no ponto 1 (captação de água); Amostras de peixes da espécie Cará (<i>Geophagus brasiliensis</i>) representados pelos números 1, 2, e 3; Tilápia rendali (<i>Tilapia rendalli</i>) representados pelos números 4 e 5; Zoiúdo (<i>Satanoperca papaterra</i>) representados pelo número 6. | 75 |
| Figura 45. Concentração de VTG encontrada nas amostras de peixes fêmeas capturados no ponto 1 (captação de água); Amostra de peixes da espécie Cará (<i>Geophagus brasiliensis</i>) representado pelo número 1, Zoiúdo (<i>Satanoperca papaterra</i>) representado pelo número 2; Tilápia rendali (<i>Tilapia rendalli</i>) representados pelos números 3 e 4. | 75 |
| Figura 46. Concentração de VTG encontrada nas amostras de Carás (<i>Geophagus brasiliensis</i>) machos capturados no ponto 5 (lançamento de esgoto)..... | 76 |
| Figura 47. Concentração de VTG encontrada nas amostras de Carás (<i>Geophagus brasiliensis</i>) fêmeas capturados no ponto 5 (lançamento de esgoto)..... | 76 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Quantidade de estrógenos encontrados no Mundo..... | 16 |
| Tabela 2. Quantidade de estrógenos encontrados no Brasil..... | 18 |
| Tabela 3. Características de alguns estrógenos | 26 |
| Tabela 4. Solubilidade de alguns estrógenos..... | 26 |
| Tabela 5. Parâmetros para a validação segundo a Resolução – RE 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária | 28 |
| Tabela 6. Coordenadas dos pontos de coleta da Represa Municipal de São José do Rio Preto – SP..... | 39 |
| Tabela 7. Limite de detecção e de quantificação do método para a análise de hormônio em água; volume de injeção: 20µL..... | 57 |
| Tabela 8. Precisão e exatidão do limite de quantificação..... | 58 |
| Tabela 9. Precisão e exatidão do método do primeiro dia de análise do 17α-etinilestradiol. | 62 |
| Tabela 10. Precisão e exatidão do método do segundo dia de análise do 17α-etinilestradiol. | 63 |
| Tabela 11. Precisão e exatidão do método do primeiro dia de análise do 17β-estradiol..... | 63 |
| Tabela 12. Precisão e exatidão do método do segundo dia de análise do 17β-estradiol..... | 63 |
| Tabela 13. Precisão e exatidão do método do primeiro dia de análise do levonorgestrel..... | 63 |
| Tabela 14. Precisão e exatidão do método do segundo dia de análise do levonorgestrel..... | 63 |
| Tabela 15. Precisão e exatidão interdias do método dos hormônios estudados..... | 64 |
| Tabela 16. Recuperação do método de extração por SPE do 17α-etinilestradiol. | 65 |
| Tabela 17. Recuperação do método de extração por SPE do 17β-estradiol..... | 65 |
| Tabela 18. Recuperação do método de extração por SPE do levonorgestrel. | 65 |
| Tabela 19. Índice Pluviométrico do mês de janeiro de 2009 | 66 |
| Tabela 20. Índice Pluviométrico do mês de março de 2009..... | 66 |

| | |
|---|----|
| Tabela 21. Índice Pluviométrico do mês de maio de 2009 | 67 |
| Tabela 22. Índice Pluviométrico do mês de julho de 2009 | 67 |
| Tabela 23. Oxigênio dissolvido, temperatura e pH das amostras de água coletadas no mês de janeiro de 2009. | 70 |
| Tabela 24. Oxigênio dissolvido, temperatura e pH das amostras de água coletadas no mês de março de 2009..... | 70 |
| Tabela 25. Oxigênio dissolvido, temperatura e pH das amostras de água coletadas no mês de maio de 2009..... | 71 |
| Tabela 26. Oxigênio dissolvido, temperatura e pH das amostras de água coletadas no mês de julho de 2009. | 71 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. JUSTIFICATIVA | 12 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA | 13 |
| 3. OBJETIVOS | 29 |
| 3.1 Objetivos gerais | 29 |
| 3.2 Objetivos específicos | 29 |
| 4. EXPERIMENTAL..... | 29 |
| 4.1. Área de estudo..... | 29 |
| 4.2. Metodologia | 31 |
| 4.2.1. Padrão..... | 31 |
| 4.2.2. Comparação dos métodos de extração por SPE de Araújo (2006) e Lopes (2007)..... | 32 |
| 4.2.3. Preparação das amostras, extração e análise | 33 |
| 4.2.4. Validação do método para a determinação dos hormônios 17 α -etinilestradiol, 17 β -estradiol e levonorgestrel | 34 |
| 4.3. Amostragem | 36 |
| 4.3.1. Coleta e armazenamento das amostras..... | 36 |
| 4.4. Análise de VTG (vitelogenina) | 41 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 43 |
| 5.1. Condições Cromatográficas para a análise de hormônios na água da Represa Municipal de São José do Rio Preto (SP)..... | 43 |
| 5.2. Comparação dos métodos de extração por SPE de Araújo (2006) e Lopes (2007) | 50 |
| 5.3. Validação do método para a análise dos hormônios em estudo..... | 53 |
| 5.3.1. Seletividade..... | 53 |
| 5.3.2. Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) | 56 |
| 5.3.3. Limite inferior de quantificação (LIQ)..... | 57 |
| 5.3.4. Linearidade..... | 58 |

| | |
|--|----|
| 5.3.5. Precisão e exatidão | 62 |
| 5.3.6. Recuperação | 64 |
| 5.4. Análise das amostras de água da Represa Municipal de São José do Rio Preto (SP) | 65 |
| 5.5. Análise de vitelogenina (VTG) | 73 |
| 6. CONCLUSÃO | 78 |
| 7. BIBLIOGRAFIA | 78 |

1. JUSTIFICATIVA

Essa pesquisa visa alertar sobre a necessidade de se adotar novas medidas para o tratamento de efluentes e de água potável, quanto à presença de medicamentos. Isso se deve às características dos estrógenos que podem causar sérios danos à saúde dos seres humanos e de animais, tais como, o processo de feminização dos peixes e câncer em seres humanos.

Um dos primeiros relatos de danos causados por EDs (desreguladores endócrinos), ocorreu entre os anos 50 e 70, onde descobriu-se que o dietilestilbestrol (DES), medicamento usado por mulheres para prevenir o aborto espontâneo, estava causando câncer vaginal, infertilidade e deformações em útero de filhas nascidas de mães que usaram o DES (OLEA et al, 2002; COLBORN et al, 2000). Os homens que trabalhavam nas fábricas que produziram este hormônio apresentaram crescimento das mamas (BOWLER; CONE, 2001) e os filhos de mães que usaram o DES contraíram a criptorquidia, determinada pela ausência de testículo (COLBORN et al, 2000).

Os estrógenos quando de origem vegetal, como o 17β -estradiol, geralmente não causam tantos danos aos seres humanos e animais, porque não se ligam facilmente aos receptores hormonais, sendo assim, são facilmente excretados e, portanto, não se acumulam nos tecidos corpóreos. Porém, quando são de origem sintética, como o 17α -etinilestradiol e o levonorgestrel, por persistirem no meio ambiente, os mesmos se acumulam no solo, sedimentos e ao longo da cadeia trófica causando descontrole hormonal o que resulta em prejuízos a saúde dos seres humanos e animais. Além disso, essas substâncias são excretadas pelo leite materno o que pode causar distúrbios no sistema hormonal de recém-nascidos (MEYER et al, 1999).

Os hormônios como o 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol e o levonorgestrel são usados como contraceptivos por mulheres, uma vez ingeridos os mesmos são excretados do corpo humano e lançados na rede de esgoto tendo como destino final rios ou represas.

Devido a todos a estes fatores, a Represa Municipal de São José do Rio Preto, que além de ser ponto de captação de água para abastecimento público de São José do Rio Preto, também recebe efluentes domésticos da cidade, necessita que estudos sejam feitos no sentido de analisar hormônios e também verificar o efeito da presença destes sobre os peixes por meio de análise de proteína vitelogenina (VTG) encontrada no sangue de peixes.

No tratamento convencional de efluentes e de água potável os estrógenos não são eliminados, por isso é necessário propor uma nova forma de tratamento, na qual essas substâncias sejam degradadas ou se tornem inativas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O crescimento populacional nas últimas décadas trouxe como consequência o aumento da produção de vários xenobióticos, esses compostos uma vez presentes no meio ambiente podem causar efeitos negativos aos seres vivos.

Um exemplo desses xenobióticos são os desreguladores endócrinos (EDs), que podem interferir no sistema endócrino afetando a saúde, crescimento e reprodução dos seres humanos e animais (BILA; DEZOTTI, 2007). Os EDs também estão relacionados com a alta incidência de câncer em seres humanos (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1997). Essas substâncias podem ser encontradas no esgoto sanitário, águas naturais e potáveis (BILA; DEZOTTI, 2007).

A EPA (Environmental Protection Agency) define um desregulador endócrino (ED) como um agente exógeno que interfere nas sínteses, secreção, transporte, ligação, ação, ou eliminação do hormônio natural do corpo que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento, e/ou comportamento (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1997).

Os EDs incluem uma variedade de substâncias, dentre elas hormônios sintetizados por vertebrados (estrógenos, andrógenos, e progesterona), fitoestrogênios, e micotoxinas, assim como substâncias sintéticas como hormônios sintéticos, pesticidas, componentes de detergentes, e poluentes que são persistentes no meio ambiente (bifenilas policloradas (PCBs), dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDDs), policlorodibenzofuranos (PCDFs)) (CARGOUËT et al, 2007).

Os hormônios esteróides (estrógenos, progesteronas, andrógenos, glucocorticóides) são substâncias biologicamente ativas que são sintetizadas pelo colesterol. Os esteróides naturais são secretados por seres humanos e animais pelo córtex supra-renal, testículos, ovários e placenta, e inclui progesteronas, glicocorticóides, mineralcorticóides, andrógenos e estrógenos (RAVEN; JOHNSON, 1999).

Todos os hormônios esteróides exercem sua função passando através da membrana plasmática e ligando-se ao receptor intracelular (YING et al, 2002). Também há hormônios esteróides sintéticos como 17α -etinilestradiol e mestranol que são usados como contraceptivos (YING et al, 2002).

Os hormônios sexuais são classificados em três grupos principais: (1) hormônios sexuais femininos, ou estrógenos, (2) hormônios sexuais masculinos, ou

andrógenos, e (3) hormônios da gravidez, ou progestógenos (SOLOMONS et al, 2000).

A ligação entre sítios receptores e hormônios pode ser bloqueada ou mimetizada de acordo com a forma e distribuição de cargas dos EDs, com isso pode-se ocorrer o desencadeamento de respostas biológicas inadequadas (SPIRO; STIGLIANI, 2009) como aceleração/atraso ou superprodução/subprodução das mensagens codificadas devido a mimetização, impedimento da regularização das funções normais devido ao bloqueio, amplificação dos sinais hormonais devido à formação de novos receptores (aceleração endócrina), ação enzimática inadequada, e destruição do hormônio ou da sua capacidade de realizar as suas funções (BIRKETT, 2003; AMERICAN CHEMISTRY COUNCIL, 2009; SHAW; JANOSEK et al, 2006).

Os estrógenos predominantes são estradiol, estrona e estriol (YING et al, 2002), uma vez no ambiente eles podem causar efeitos danosos à reprodução de organismos aquáticos incluindo a inibição da implantação do óvulo, a supressão da espermatogênese e impotência (LEWIS et al, 1991).

Normalmente, os estrógenos são excretados do corpo humano indo parar nos efluentes domésticos e atingem o sistema aquático, sendo a sua principal fonte as mulheres, que excretam diariamente entre 10 a 100 μ g de 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, estrona e estriol, enquanto que as mulheres grávidas podem excretar até 30mg de estrogênio por dia (BARONTI et al, 2000).

Os hormônios são excretados na forma conjugada, mas há estudos que demonstram que eles também são encontrados na forma livre em esgotos, sendo desconjugados pela enzima β -glucuronidase produzida pela bactéria *Escherichia coli* (D'ASCENZO et al, 2003).

Estudos demonstram a presença de hormônios nas águas de rios, no esgoto após tratamento e na água potável (Tabelas 1 e 2). A sua presença, em água potável, é devido ao hormônio não ser removido pelo tratamento da água de abastecimento (ETA) convencional (KOLPIN et al., 2002; WESTERHOFF et al., 2005).

Tabela 1. Quantidade de estrógenos encontrados no Mundo (Adaptado de Liu et al, 2009).

| Hormônio | Região | Matriz | Concentração (ngL ⁻¹) | Referência |
|---------------|---|------------------------------|-----------------------------------|--|
| 17β-estradiol | Países Baixos | Água superficial | <0,3–5,5 | Belfroid et al (1999) |
| | Massachusetts, Estados Unidos | Água subterrânea | n.d.-45 | Swartz et al (2006) |
| | Sul da Alemanha | Água Potável | 0,2–2,1 | Kuch e Ballschmiter (2001) |
| | Roma, Itália | Afluente ETE Efluente ETE | 4,0-25 0,35–3,5 | Baronti et al (2000) |
| | Japão | Água superficial | 0,6–1,0 | Isobe et al (2003) |
| | Noroeste do Arkansas | Água subterrânea | 6–66 | Peterson et al (2000) |
| | Nevada, Estados Unidos | Água Potável | 2,6 | Roefer et al (2000 apud NGHIEM et al, 2004); |
| | Roma, Itália | Afluente ETE Efluente ETE | 11 1,6 | D'Ascenzo et al (2003) |
| | Países baixos | Água superficial | <0,8–1,0 | Vethaak et al (2005) |
| | Planalto Aquático Ozark, Estados Unidos | Água subterrânea | 13–80 | Wicks et al (2004) |
| | Praga, República Checa | Água Potável | n.d.–2,6 | Morteani et al(2006) |
| | Austria | Afluente ETE Efluente ETE | 35–125 n.d–30 | Clara et al (2005) |
| | Roma, Itália | Água superficial | 2–6 | Lagana et al (2004) |
| | Austria | Água subterrânea | n.d.–0,79 | Hohenblum et al (2004) |

(Continua)

| Hormônio | Região | Matriz | Concentração (ngL ⁻¹) | Referência |
|---|--|------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| 17 α -etilestradiol | Canadá | Afluente ETE | 2,4–26 | Servos et al (2005) |
| | | Efluente ETE | 0,2–14,7 | |
| | Nebraska, Estados Unidos | Água superficial | n.d.-8,8 | Kolok et al.(2007); |
| | Países baixos | Afluente ETE | 17–150 | Vethaak et al (2005) |
| | | Efluente ETE | < 0,8 | |
| | Califórnia, Estados Unidos | Água superficial | < 0,7–1,7 | Kolodziej e Sedlak (2007) |
| | Austrália | Afluente ETE | 22,0 | Braga et al (2005) |
| | | Efluente ETE | 0,95 | |
| | China | Água superficial | 1,6–15,5 | Shen et al (2001) |
| | Sudeste da Pensilvânia, Estados Unidos | Afluente ETE | n.d.–161,6 | Robert et al (2007) |
| | | Efluente ETE | n.d.–5,4 | |
| | Praga, República Checa | Água superficial | n.d.–3,8 | Morteani et al (2006) |
| | Canadá | Afluente ETE | 0–11 | Fernandez et al (2007) |
| | | Efluente ETE | 0–158 | |
| | Países Baixos | Água superficial | < 0,1–4,3 | Belfroid et al (1999) |
| | Austria | Água subterrânea | n.d.–0,94 | Hohenblum et al (2004) |
| | Sul da Alemanha | Água Potável | 0,15–0,5 | Kuch e Ballschmiter (2001) |
| | Roma, Itália | Afluente ETE | 0,40–13 | Baronti et al (2000) |
| | | Efluente ETE | n.d.–1,7 | |
| | Países baixos | Água superficial | < 0,3–0,4 | Vethaak et al (2005) |
| Paris, França | Afluente ETE | 4,9–7,1 | Cargouet et al (2004) | |
| | Efluente ETE | 2,7–4,5 | | |
| Roma, Itália | Água superficial | n.d.–1 | Lagana et al (2004) | |
| Países baixos | Afluente ETE | < 0,3–5,9 | Vethaak et al(2005) | |
| | Efluente ETE | < 0,3–2,6 | | |
| China | Água superficial | 5,7–30,8 | Shen et al (2001) | |
| Austria | Afluente ETE | 3–70 | Clara et al (2005) | |
| | Efluente ETE | n.d.–5 | | |
| Sul da Alemanha | Água superficial | 0,1–5,1 | Kuch e Ballschmiter (2001) | |
| California, Arizona, Virginia e Wisconsin, Estados Unidos | Afluente ETE | < 0,7–14,4 | Drewes et al (2005) | |
| | Efluente ETE | < 0,7–4,1 | | |

(Conclusão)

| Hormônio | Região | Matriz | Concentração (ngL ⁻¹) | Referência |
|-----------------|--|------------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| | Praga, República Checa | Água superficial | n.d.-4,6 | Morteani et al (2006) |
| | Sudeste da Pensilvânia, Estados Unidos | Afluente ETE Efluente ETE | n.d.-1,2 n.d.-0,6 | Robert et al (2007) |
| | Paris, França | Água superficial | 1,1-2,9 | Cargouet et al (2004) |
| | Canadá | Afluente ETE Efluente ETE | 0-2 0-178 | Fernandez et al (2007) |
| Levonorgestrel* | - | - | - | - |

* não encontrado na literatura; n.d. (não detectado).

Tabela 2. Quantidade de estrógenos encontrados no Brasil.

| Hormônio | Região | Matriz | Concentração (ngL ⁻¹) | Referência |
|---------------------|---------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|---------------------|
| 17β-estradiol | Metropolitana de Campinas | Afluente ETE | 6700 | Ghiselli (2006) |
| | | Efluente ETE | 5600 | |
| | | Água superficial | 1900 -6000 | |
| | | Água potável | 2100 -2600 | |
| | Araraquara, SP | Efluente ETE | 31 | Araújo (2006) |
| | Bacia do Rio Atibaia, SP | Água superficial | 106 – 6806 | Raimundo (2007) |
| | Córrego Rico, SP | Água superficial | 8,6 a 30,6 | Lopes (2007) |
| | Campo Grande, MS | Água potável Água superficial | 6,8 > 6,5 | Souza (2008) |
| 17α-etinilestradiol | UGRHI -13 | Efluente ETE | > 6,5 | Moura (2009) |
| | | Afluente ETE | 84±6 - 5960±3 | |
| | | Efluente ETE | n.d. – 822±10 | |
| | Campo Grande, MS | Água superficial | > 6,25 | Souza (2008) |
| | | Efluente ETE | > 25 | |
| | Rio de Janeiro | Esgoto Doméstico | 21 | Ternes et al (1999) |
| | Metropolitana de Campinas | Afluente ETE | 5800 | Ghiselli (2006) |
| | | Efluente ETE | 5000 | |
| Água superficial | | 1200 -3500 | | |
| Água potável | | 1600 -1900 | | |
| UGRHI -13 | Afluente ETE | n.d.- 484±15 | Moura (2009) | |
| | Efluente ETE | n.d. - 192±3 | | |

(Continua)

| Hormônio | Região | Matriz | Concentração | Referência |
|-----------------|----------------|------------------|--------------|---------------------|
| Levonor gestrel | Rio de Janeiro | Água superficial | n.d. | Kuster et al (2009) |

n.d. (não detectado).

Segundo Johnson et al (2001) os desreguladores endócrinos 17β -estradiol (E2) e o 17α -etinilestradiol têm grande potência estrogênica, sendo o primeiro encontrado em efluentes de estação de tratamento de efluentes (ETE) e água de superfície em baixas concentrações e, o 17α -etinilestradiol em efluentes de ETE.

A exposição de fetos a estrogênios pode torná-lo quando adulto mais suscetível a câncer de próstata, genitália, mama, ovário e útero, e pode também influenciar na orientação sexual (WINGARD et al., 1998; PALMLUND et al., 1993). Além disso, há estudos indicando que o câncer vaginal está associado à exposição de mulheres aos hormônios sintéticos (TAKAI; TSUTSUMI, 2000).

Para proteger a qualidade das águas dos desreguladores endócrinos os órgãos como União Européia (EU), Agência de Proteção Ambiental do Norte da América (EPA), Organização Mundial de Saúde (WHO), ou Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) publicam diretrizes e leis (ESPLUGAS et al, 2007).

No Brasil, a Portaria 518 do Ministério da Saúde, de 25 de Março de 2004, define os padrões de potabilidade. Nesta, a maioria dos desreguladores endócrinos (EDs) não constam, assim como os hormônios, e portanto não são analisados nas estações de tratamento de água (ETA).

As quantidades elevadas de estrógenos encontradas em água no Brasil (Tabela 2) em comparação com as encontradas no exterior (Tabela 1) estão diretamente ligadas a altas temperaturas do clima que causam uma maior ocorrência

de estrógenos livres. A influência da temperatura na quantidade de estrógenos encontrados foi relatado por Fernandez et al (2008) que demonstrou que existe uma quantidade maior de estrógenos livres em temperaturas elevadas em um trabalho sobre a influência da sazonalidade na redução da atividade estrogênica de amostras de esgoto em uma estação de tratamento de esgoto municipal do Norte do Canadá.

A proteína vitelogenina (VTG) é produzida pelo fígado na maturidade sexual para o desenvolvimento dos folículos, e está diretamente relacionada com a quantidade de estrogênio no sangue que é responsável pela diferenciação sexual e maturação. Devido a isso, a exposição de machos aos estrógenos em certos níveis faz com que o organismo passe a produzir elevadas quantidades de vitelogenina (VTG) que é em circunstâncias normais uma proteína específica encontrada em vertebrados ovíparos do sexo feminino (ROUTLEDGE et al, 1998), resultando assim, por exemplo, em característica hermafrodita em peixes machos (COLBORN et al., 1993; GRAY; METCALFE, 1997; JOBLING; SUMPTER, 1993; JOBLING et al., 1998; ROUTLEDGE et al., 1998; TYLER et al., 1998).

A vitelogenina (VTG) está presente em condições normais em peixes machos, mas não é expressivo pela pequena quantidade de estrogênio no sangue (SCHMID et al, 2002). A presença de altas quantidades de vitelogenina (VTG) no plasma de peixes machos indica a presença de substâncias que causam efeito endócrino (JOHNSON et al, 2000; ZERULLA et al, 2002) na água, portanto, esta proteína pode ser usada como um bioindicador. Folmar et al (2000) demonstrou que a produção da proteína VTG em peixes machos é dez vezes maior quando estes são expostos ao 17α -etinilestradiol em comparação com o 17β -estradiol.

Uma das técnicas utilizadas para a análise de VTG em peixes machos é o ensaio de ELISA, esta técnica vem sendo utilizada por vários pesquisadores como

Fenske et al (2001), Urbatzka et al (2007), Mortensen e Arukwe (2007), King et al (2008), Guzmán et al (2008) e Thorpe et al (2009). Peixes expostos a desreguladores endócrinos com potencial estrogênico possuem valores de VTG que podem variar de ngmL^{-1} a mgmL^{-1} (BENFEY et al, 1989; ARUKWE; GOKSØYR, 2009).

Na Inglaterra e País de Gales, Purdom et al (1994) fizeram um estudo sobre a influência dos efluentes de origem industrial e doméstico provenientes de estação de tratamento de esgoto (ETE) sobre trutas arco-íris machos e observaram que os peixes que sobreviveram possuíam no plasma nível de VTG de 500 a 50.000 vezes maior que o normal, em ambientes considerados mais estrogênicos o nível de VTG no plasma dos peixes foram maiores que 100mgmL^{-1} .

Harris et al (1996, 1997) comprovaram a persistência da atividade estrogênica ao longo do rio expondo trutas arco-íris machos a efluentes de ETE em até 5km de distâncias da descarga dos efluentes. Os autores encontraram uma alta concentração de VTG nos peixes estudados, sendo o mínimo de 25mgmL^{-1} e o máximo de 52mgmL^{-1} , também foi observada redução do crescimento dos testículos destes animais.

Rodres-Gray et al (2000) quantificaram o hormônios 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol e estrona no efluente de ETE do Reino Unido nas concentrações de 4; 1,7-3,4 e 50ngL^{-1} e observaram que no plasmas dos peixes *Rutilus rutilus* desta ETE havia um aumento no nível de VTG.

Segundo Colborn et al (1993) a exposição a EDs também pode causar a disfunção da tireóide de pássaros e de peixes; diminuição da fertilidade em pássaros, peixes, mariscos, e mamíferos; e feminização de peixes machos, pássaros e mamíferos. Além disso, as substâncias estrogênicas causam mudanças

permanentes no cérebro de animais, no epitélio vaginal em fêmeas e próstata de machos, portanto há probabilidade que possam causar efeitos similares em seres humanos mesmo em níveis baixíssimo de concentração.

Estudos feitos em laboratório, onde peixes machos foram expostos a estrógenos naturais e sintéticos resultaram em feminização/reversão sexual, intersexo, fraca diferenciação sexual, inibição do crescimento testicular, inibição da espermatogênese, decrescimento da capacidade de fertilização dos ovos, redução da produção dos hormônios sexual masculino (testoterona e/ou 11-ketotestoterona), e alteração no comportamento reprodutivo (MILLS; CHICHESTER, 2005; SUMPTER, 2005).

Devido a esses fatores, deve-se ter uma atenção especial para monitorar os hormônios e também para fazer a remediação (ROUTLEDGE et al, 1998). O maior problema é que os estrogênios naturais e sintéticos (17β -estradiol (E2), 17α -etinilestradiol (EE2), estrona (E1), estriol (E3); nonilfenol, e octilfenol), não são degradados pelo tratamento de esgoto convencional (D'ASCENZO et al., 2003; DESBROW et al., 1998; LEE; PEART, 1998; SNYDER et al., 1999) persistindo assim no meio ambiente.

Estudos com levonorgestrel demonstraram que doses de 15mg ou 30mg, três vezes ao dia, provocaram alterações no crescimento e peso de alguns órgãos de ratos na fase adulta ou puberdade (GUERRA et al, 1999; SOUZA et al, 2000).

Quando peixes são expostos às concentrações de $1-10\text{ngL}^{-1}$ de 17β -estradiol e $0,1\text{ngL}^{-1}$ anticoncepcional 17α -etinilestradiol já resulta em feminização (BARONTI et al, 2000), por isso identificando e quantificando o estrógeno em água de rios é possível verificar se há interferência na fisiologia das espécies de peixes e se há alterações no sistema endócrino da comunidade aquática.

É importante ressaltar que a contínua introdução de hormônios no meio ambiente concede-lhes um caráter de persistência, pois esses compostos possuem caráter lipofílico (NOGUEIRA, 2003). Além de estarem presentes na água, estas substâncias são acumuladas nos sedimentos, e bioacumulados em organismos aquáticos, devido ao permanente contato direto da fauna com as águas contendo tais compostos, o que facilita a entrada dos desreguladores endócrinos pelos sistemas respiratório e digestivo (NOGUEIRA, 2003).

Os desreguladores endócrinos são encontrados em efluentes, no solo e também na atmosfera em forma de partículas e aerossóis (CAMPBELL et al, 2006). Devido as suas características os desreguladores endócrinos são transportados ou reagem com alguns compostos gerando assim um ciclo que está representado na Figura 1.

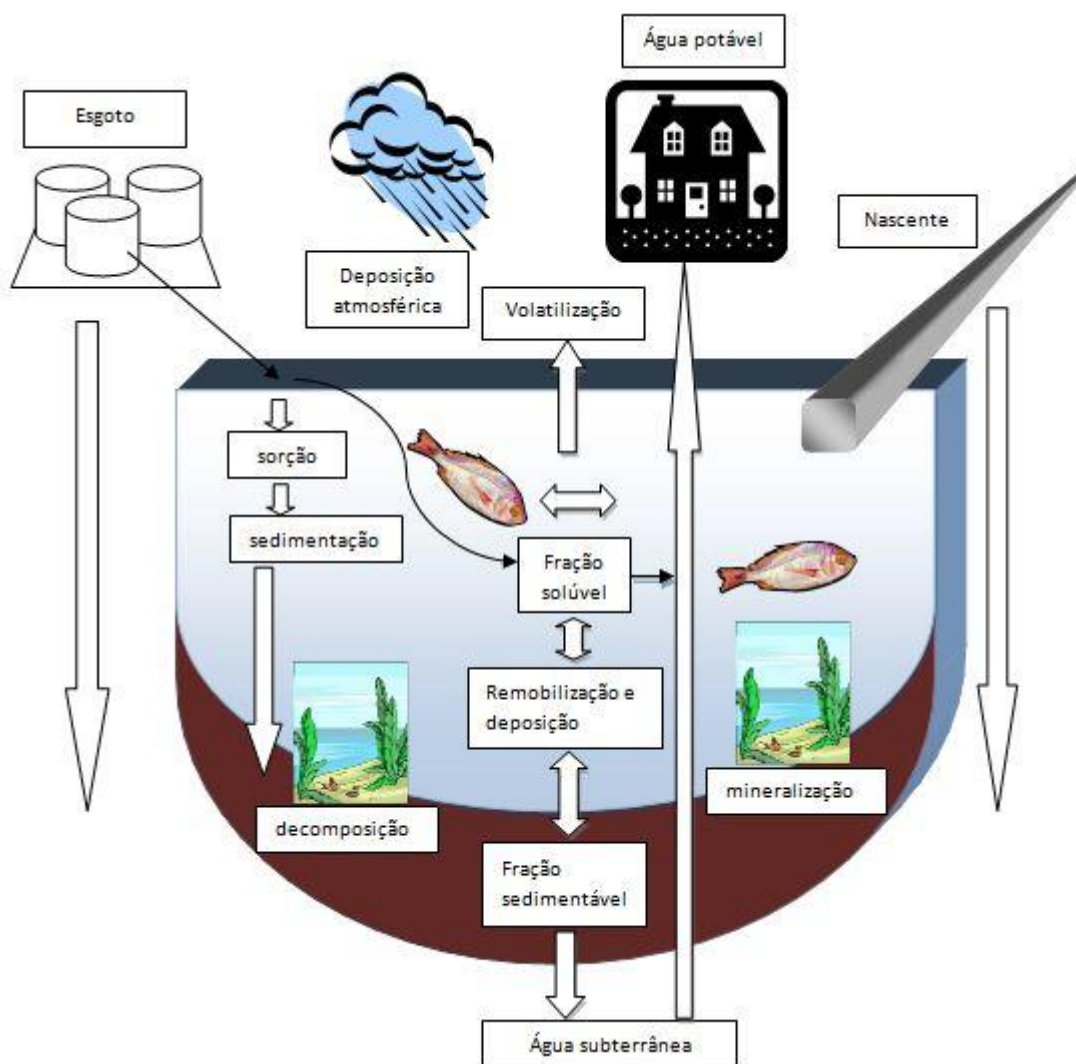


Figura 1. Representação das possíveis fontes de contaminação por EDs (CAMPBELL et al, 2006).

Atualmente, os métodos estudados para a remoção dos desreguladores endócrinos presentes na água são os processos oxidativos avançados (POA) como UV/O₃ (IRMAK et al, 2005; WESTERHOFF et al.,2005), fotocatalise (H₂O₂/UV e TiO₂) (ROSENFELDT et al, 2004; BILA; DEZOTTI, 2007; ZHANG et al, 2007), eletrólise (PAUWELS et al, 2006) e ozonização (IRMAK et al, 2005; MANIERO et al, 2008); fotodegradação por UV-vis/Fe(III)/ H₂O₂ (FENG et al, 2005), biodegradação (ROBINSON; HELLOU, 2009), cloração (HU et al, 2003; DEBORDE et al, 2004), entre outros.

As características dos estrogênios são importantes para saber quais as rotas que serão utilizadas por estas substâncias no ambiente e também os métodos que serão utilizados para a sua determinação analítica. Os estrogênios possuem o ciclopentanoperhidrofenantreno como característica em comum, sendo sintetizados a partir do colesterol. A Figura 2 apresenta a fórmula estrutural das substâncias estudadas.

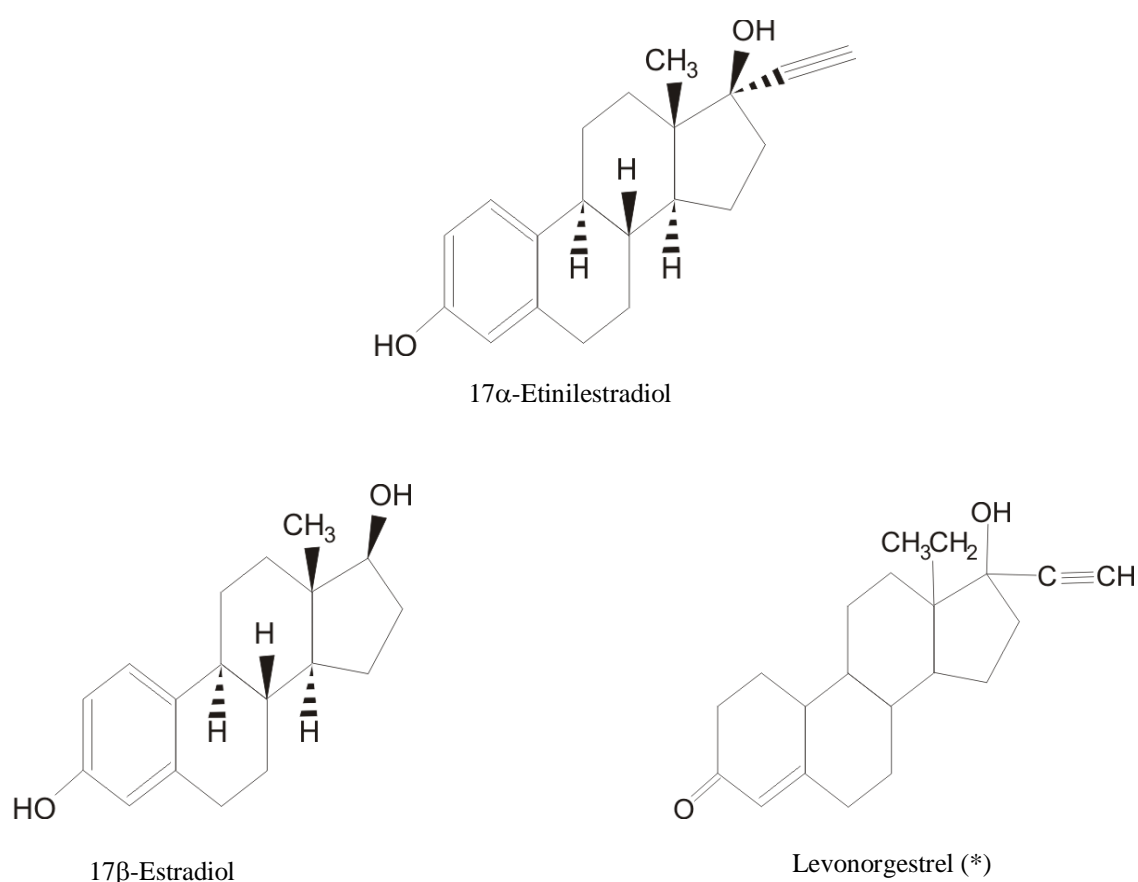


Figura 2. Estrutura dos estrógenos a serem estudados (YING et al, 2002; * ALDA et al, 2000).

Devido aos valores de log K_{oc} dos estrógenos, Tabela 3, que é o coeficiente de partição entre a fase aquosa e sólida, observa-se que os hormônios permanecem na água, mas há uma pequena fração que formam complexos com matéria orgânica presentes nos sedimentos (CAMPBELL et al, 2006).

Tabela 3. Características de alguns estrógenos (CAMPBELL et al, 2006).

| EDC | LogKoc (L/Kg) | pKa |
|-----------------|----------------------|-------------|
| 17β-estradiol | 3,10-4,01 | 10,71 |
| Estrona | 2,45-3,34 | 10,3 - 10,8 |
| Etinilestradiol | 2,91-3,04 | - |
| Estriol | 2,13-2,62 | 10,4 |

Os hormônios podem atingir também os corpos d'água por escoamento superficial em áreas onde foi aplicado biossólido ou excretas de animais no solo (LEE et al., 2003). A Tabela 4 apresenta a pressão de vapor e a solubilidade de hormônios.

Tabela 4. Solubilidade de alguns estrógenos (LAI et al, 2000).

| Estrógenos | Pressão de Vapor (Pa) | Solubilidade em água (mgL⁻¹) |
|---------------------|------------------------------|--|
| Estradiol | $3,0 \cdot 10^{-8}$ | 13 |
| Estrona | $3,0 \cdot 10^{-8}$ | 13 |
| Estriol | $9,0 \cdot 10^{-13}$ | 13 |
| 17α-Etinilestradiol | $6,0 \cdot 10^{-9}$ | 4,8 |
| Mestranol | $1,0 \cdot 10^{-7}$ | 0,3 |

Como uma concentração muito baixa, 10ngL^{-1} de hormônio, é capaz de causar efeito biológico em organismos aquáticos (BAREL- COHEN et al., 2006), a solubilidade apresentada na Tabela 4, pode ser considerada muito alta.

As baixas pressões de vapor indicam a baixa volatilidade dessas substâncias e, portanto não devem ser analisadas diretamente por cromatografia em fase gasosa e sim em fase líquida.

Devido a todos esses fatores já citados, torna-se imprescindível o desenvolvimento de uma metodologia, capaz de atingir concentrações diminutas com um alto grau de confiança. Para se obter tal grau de confiabilidade nos

resultados analíticos deve-se fazer a validação do método, que segundo a Resolução – RE 899 da Agência Nacional de Vigilância sanitária (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008) é a garantia que o método tenha confiabilidade dos resultados, sendo atendidos as suas exigências analíticas por meio de estudos experimentais.

A validação do método foi baseada na Resolução – RE 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008). Esta é utilizada para a validação de metodologia para ensaios de bioequivalência de fármacos em matrizes biológicas (plasma, sangue, urina, etc) as quais são consideradas complexas em função dos inúmeros e diversificados interferentes presentes nestas matrizes. O mesmo comportamento é observado nas águas provenientes de rio. Por este motivo, pode-se validar o método a ser empregado na determinação de hormônios sintéticos e naturais em água de rio baseando-se na referida norma.

Os parâmetros (Tabela 5) para a validação definidos pela norma são: seletividade, limite de detecção e quantificação, limite inferior de quantificação, linearidade, precisão e exatidão intra-corrída e inter-corrída, e recuperação.

Tabela 5. Parâmetros para a validação segundo a Resolução – RE 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008).

| Parâmetro | Definição |
|----------------------------------|---|
| Seletividade | Realizada para se determinar interferentes próximos ao tempo de retenção do analito que possa interferir na análise do resultado, obtendo falsos positivos ou negativos |
| Limite de detecção | Menor concentração do analito que se consegue diferenciar com confiabilidade do ruído |
| Limite de quantificação | Menor concentração de um analito que se consegue quantificar |
| Limite inferior de quantificação | Possui a mesma definição do limite de quantificação, no entanto deve ter exatidão e precisão dentro dos limites aceitáveis e definidos pela norma |
| Linearidade | Capacidade de se obter resultados proporcionais à concentração do analito |
| Precisão | Grau de repetibilidade dos resultados mantendo-se as mesmas condições |
| Exatidão | Capacidade de se obter resultados com concordância entre os encontrados individualmente e um valor de referência |
| Recuperação | Eficiência de extração do método analítico em questão |

Devido à baixa concentração (ngL^{-1} e μgL^{-1}) que os hormônios naturais e sintéticos são encontrados nas matrizes ambientais muitos métodos analíticos foram desenvolvidos. Alguns métodos utilizados para a determinação de hormônio são análise por HPLC com detectores eletroquímico (PEÑALVER et al, 2002), espectrômetro de massas (VIGANÒ et al, 2008; PEDROUSO et al, 2009; CHEN et al., 2007), fluorescência (MATSUMOTO et al, 2002; YOONA et al., 2003), e ultravioleta com varredura de diodo (ALDA; BARCELÓ, 2001; ALMEIDA et al., 2006).

Segundo ALDA et al (2003) e PETROVIC et al (2002), a extração em fase sólida (SPE) com adsorvente octadecilsilano (C18) é a técnica mais aplicada para a extração de estrógenos. Esta técnica consiste primeiramente no condicionamento do cartucho com sorvente, posteriormente extração conjunta do analito e dos

interferentes da matriz aquosa, utiliza-se um solvente orgânico para a eluição dos interferentes e outro solvente para a eluição do analito (BARRIONUEVO; LANÇAS, 2001).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Determinação de estrógenos na água da Represa Municipal de São José do Rio Preto – SP, nos períodos chuvosos e secos, e quantificação do bioindicador de efeito hormonal VTG em plasma de peixes.

3.2 Objetivos específicos

- Validar o método a ser empregado para a determinação dos hormônios naturais (17β -estradiol) e sintéticos (levonorgestrel e 17α -etinilestradiol);
- Determinar os hormônios naturais (17β -estradiol) e sintéticos (levonorgestrel e 17α -etinilestradiol) em amostras de água da Represa Municipal de São José do Rio Preto, SP.
- Quantificação do bioindicador VTG em plasma de peixes da Represa Municipal de São José do Rio Preto, SP.

4. EXPERIMENTAL

4.1. Área de estudo

Em 1974 a CETESB iniciou o Monitoramento das Águas Interiores do Estado de São Paulo (BRASIL, 2009), e desde 1990 desenvolve o monitoramento das

águas de abastecimentos nas 22 Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRH), nas quais o Estado de São Paulo foi dividido.

O presente estudo foi desenvolvido na UGRHI (Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos) 15, a qual é composta por 64 municípios, sendo que 91% dos habitantes vivem em áreas urbanas, e possui uma área de drenagem de 15.925 km², a qual a Represa Municipal de São José do Rio Preto está incluída (BRASIL, 2008).

Segundo avaliação da CETESB quase todos os recursos hídricos da UGRHI 15 apresentam qualidade ruim quanto aos parâmetros indicadores de poluição causada por esgoto sanitário. Nesta região é coletado 97% do esgoto e somente 29% é tratado (BRASIL, 2008).

A principal utilização das águas dos rios da UGRHI 15 é para o abastecimento público e industrial, afastamento de esgotos sanitários e industriais e irrigação de culturas (BRASIL, 2008).

Na cidade de São José do Rio Preto, que possui atualmente 402.770 habitantes, sendo que destes 159.536 são mulheres (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2009), os efluentes domésticos são lançados sem tratamento na Represa Municipal, na qual há pontos de captação de água para abastecimento público de 33% da população (FOLHA online, 2009).

Devido a esses fatores, é necessário se estudar a Represa Municipal de São José do Rio Preto, quanto a presença dos hormônios estrógenos e quais as possíveis conseqüências desses no sistema aquático. A Figura 3 apresenta o mapa da Represa Municipal de São José do Rio Preto, local este onde foram coletas as amostras de água e de peixes neste estudo.



Figura 3. Foto de satélite da Represa Municipal de São José do Rio Preto (GOOGLE EARTH, 2009).

4.2. Metodologia

4.2.1. Padrão

Foi preparada um solução estoque de 100mgL^{-1} de cada hormônio em metanol (P.A., Tedia[®], C.A.S. No.: 67-56-1) grau HPLC, que foram armazenadas em frascos de vidro âmbar e estocadas a 4°C . A partir dessa solução foram preparadas as outras soluções, sendo que estas eram diluídas em água de nascente para posterior quantificação em HPLC com detector de fluorescência (FLU), para 17β -

estradiol e 17 α -etinilestradiol, e detector de arranjos de diodo (DAD) para levonorgestrel, pois este não emite radiação fluorescente considerável para quantificação a nível de traços.

4.2.2. Comparação dos métodos de extração por SPE de Araújo (2006) e Lopes (2007)

Comparou-se dois métodos de extração com SPE. O primeiro foi desenvolvido por Araújo (2006) no qual 100mL de amostra à temperatura ambiente foi filtrada à vácuo em membrana de 45 μ m, depois foi homogeneizada e feita a sua extração. O adsorvente (SPE C-18) foi condicionado com 5mL de metanol, 7 mL de acetonitrila e 5mL de água livre de orgânicos, com fluxo de 3 mLmin⁻¹, depois eluiu-se uma amostra de 100mL (fluxo de 2mLmin⁻¹), lavou-se o cartucho com 5mL de água livre de orgânicos e secou-se à vácuo (40 a 50kPa) por 1 hora. O extrato foi coletado e seco sob suave fluxo de nitrogênio. Após o mesmo foi reconstituído com 500 μ L de metanol e homogeneizado. O segundo método comparado foi desenvolvido por Lopes (2007) e tem como metodologia a filtração de 1000mL de amostra e extração com SPE, com vazão de 6mLmin⁻¹, o adsorvente (SPE C-18) foi então condicionado com 6mL de hexano, 2mL de acetona, 6mL de metanol e 10mL de água ultrapura pH 3,0. Eluiu-se a amostra através do cartucho (SPE-C18), fez-se o clean-up com 10mL de água/metanol (9:1) e deixou-se secar por 3 minutos. Após estes procedimentos foi feita eluição com 4mL de acetona, secagem do mesmo com nitrogênio gasoso e redissolução com 500 μ L de acetonitrila (LOPES, 2007).

Para comparar os dois métodos foi feita uma modificação na metodologia de Lopes (2007) para que a quantidade de amostra que fosse eluída através do

cartucho permanecesse igual nos dois métodos, ou seja, ao invés de se eluir 1000mL de amostra através do cartucho utilizou-se 100mL.

4.2.3. Preparação das amostras, extração e análise

Primeiramente a água da represa em temperatura ambiente foi filtrada à vácuo com filtro de acetato de celulose de poro 0,45 μ m, a fim de se eliminar as partículas sólidas em suspensão.

O cartucho de extração em fase sólida (SPE- C18 AccuBOND II de 500mg e 6mL, Agilent Technologies®, Part No.: 188-1356) foi condicionado com 6mL de hexano (P.A., UltimAR®, C.A.S. No.: 110-54-3), 2mL de acetona (P.A., ChromAR®, C.A.S. No.: 67-64-1), 6mL de metanol (P.A., Tedia®, C.A.S. No.: 67-56-1) e 10mL de água ultrapura (Millipore®) pH 3,0. Em seguida, eluiu-se através do cartucho a amostra, ou seja, 200mL de água da represa filtrada. Na etapa de clean-up foram utilizados 10mL de água/metanol (9:1) e deixou-se secar por 3 minutos. Posteriormente, fez-se a eluição do analito de interesse com 4mL de acetona (P.A., ChromAR®, C.A.S. No.: 67-64-1), secagem com nitrogênio gasoso e redissolução com 500 μ L de acetonitrila (P.A., J. T. Baker®, C.A.S. No.: 75-05-8). Todo procedimento citado foi feito em 15kPa.

As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (Agilent Technologies® 1200 series) para os hormônios 17 α -etinilestradiol (excitação: 230nm; emissão: 306nm) e 17 β -estradiol (excitação: 230nm; emissão: 306nm), e detector de arranjos de diodo (Agilent Technologies® 1200 series) para o levonorgestrel (240nm).

A fase móvel utilizada foi acetonitrila e água ultrapura (50:50), com corrida de dez minutos para 17 α -etinilestradiol e de 25 minutos para o levonorgestrel. Já para o

17 β -estradiol utilizou-se fase móvel de acetonitrila e água ultrapura (60:40) com corrida de dez minutos.

Utilizou-se a coluna C-18 (Zorbax SB 4,6 x 250mm, 5 μ m, Agilent Technologies[®]) para 17 α -etinilestradiol e levonorgestrel. Já para o 17 β -estradiol utilizou-se a coluna PAH (LiChrospher PAH, 250 x 4,6 mm , 5 μ m, Agilent Technologies[®]), pois o referido hormônio não apresentou reprodutibilidade com a coluna C-18 (Zorbax SB 4,6 x 250mm, 5 μ m, Agilent Technologies[®]).

4.2.4. Validação do método para a determinação dos hormônios 17 α -etinilestradiol, 17 β -estradiol e levonorgestrel

Nesta etapa todas as amostras foram preparadas com água de nascente (considerada isenta dos analitos de interesse) e adição do analito em questão, ou seja, o padrão do hormônio foi adicionado à água de nascente filtrada completando o volume para 200mL. Após essa etapa, a amostra foi extraída por SPE e analisada por HPLC/FLU/DAD.

As etapas foram procedidas da seguinte maneira:

- **Seletividade:** Nessa etapa foi analisada uma amostra do branco, ou seja, a matriz sem o analito e uma amostra fortificada com o analito, ou seja, água ultrapura com o analito de interesse, ambos foram analisados nas mesmas condições cromatográficas.

- **Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ):** foram preparadas diferentes concentrações do analito adicionado a água de nascente. O limite de detecção deve ser de duas a três vezes maior que a amplitude do ruído, já o limite de quantificação tem de ser no mínimo cinco vezes maior que a amplitude do ruído.

- **Limite Inferior de quantificação (LIQ):** Conhecendo-se a concentração do limite de quantificação (LQ) preparou-se cinco amostras diferentes da mesma. Havendo precisão e exatidão dentro dos limites aceitáveis, ou seja, precisão de até 20% e exatidão de 80 a 120%, admite-se esse valor como limite inferior de quantificação (LIQ). Caso não haja precisão e exatidão aceitáveis deve-se aumentar a concentração até obter os resultados considerados aceitáveis.

- **Linearidade:** A curva de calibração foi determinada utilizando-se seis concentrações diferentes, sendo que para cada nível de concentração foi analisada em triplicata. Para que a curva fosse aceita o LIQ deve ter desvio de até 20% comparada com a concentração nominal e para as outras concentrações desvio de até 15%; no mínimo quatro concentrações da curva de calibração devem cumprir os critérios anteriores, sendo obrigatório para o LIQ e a maior concentração da curva de calibração; e coeficiente de correlação linear deve igual ou superior a 0,98.

- **Precisão e exatidão:** Foram feitas cinco concentrações diferentes abrangendo as concentrações baixa, média e alta. Para cada concentração foram preparadas cinco amostras, as quais foram extraídas e analisadas. Essa etapa foi repetida duas vezes em dias diferentes para determinar a precisão e exatidão intra-corrída e inter-corrídas, sendo que o desvio ou coeficiente de variação deve ser de até 15% para todas as concentrações, menos para o LIQ que é admitido até 20%, e a exatidão deve estar entre 80 a 120%.

- **Recuperação:** Nesta etapa preparou-se concentrações diferentes abrangendo novamente as concentrações baixa, média e alta da linearidade do método, e para cada concentração fez-se três amostras, que posteriormente foram extraídas e analisadas. Foram feitas também estas mesmas concentrações, e para cada uma fez-se três amostras, que não foram extraídas por SPE, ou seja, foram

injetadas diretamente no HPLC/FLU/DAD. Os resultados obtidos das amostras, que devem ser precisos e exatos, com extração e sem extração por SPE foram comparados.

4.3. Amostragem

4.3.1. Coleta e armazenamento das amostras

Os pontos de coleta foram definidos de acordo com os pontos onde há lançamentos de esgotos (pontos 2, 3, 4 e 5) devido à excreção dos hormônios por seres humanos na rede coletora de esgotos. E também houve coleta nos locais onde há captação de água (pontos 1 e 6) para abastecimento da população local, para se avaliar a quantidade de hormônios na água.

Os pontos de coleta demonstrados por fotos (Figuras 4 a 9) apresentam as coordenadas geográficas de acordo com a Tabela 6.



Figura 4. Ponto 1 – Ponto de coleta de água para abastecimento da população (Foto Daniela; 2009).



Figura 5. Ponto 2 – Lançamento de esgoto (Foto Daniela; 2009)



Figura 6. Ponto 3 – Lançamento de esgoto (Foto Daniela; 2009)



Figura 7. Ponto 4 – Lançamento de esgoto (Foto Daniela; 2009)



Figura 8. Ponto 5 – Lançamento de esgoto (Foto Daniela; 2009)



Figura 9. Ponto 6 – Ponto de coleta de água para abastecimento da população (Foto Daniela; 2009).

Tabela 6. Coordenadas dos pontos de coleta da Represa Municipal de São José do Rio Preto – SP.

| Ponto de Coleta | Latitude | Longitude |
|------------------------|-----------------|------------------|
| Ponto 1 | 20°48'31.86"S | 49°22'23.34"O |
| Ponto 2 | 20°48'36.84"S | 49°22'16.01"O |
| Ponto 3 | 20°48'26.89"S | 49°21'57.42"O |
| Ponto 4 | 20°48'25.48"S | 49°21'46.86"O |
| Ponto 5 | 20°48'35.30"S | 49°21'26.27"O |
| Ponto 6 | 20°48'39.25"S | 49°21'06.55"O |

As amostras foram coletadas durante a estação chuvosa (janeiro e março/2009) e seca (maio e julho/2009), na Represa Municipal de São José do Rio Preto, em horários determinados devido à diferença nas características do esgoto durante o dia, fazendo após esse procedimento a análise de hormônios femininos naturais e sintéticos. Foram feitas análises de pH e oxigênio dissolvido para informação complementar. Também verificou-se a temperatura durante a coleta de cada ponto.

A importância de se monitorar o pH é que o mesmo influencia diretamente sobre a fisiologia de espécies presentes na água da represa e, indiretamente sobre a precipitação de elementos químicos tóxicos, como metais pesados, e na

solubilidade de nutrientes (BRASIL, 2009). Já a análise do oxigênio dissolvido (OD) é utilizada como indicativo do nível de poluição uma vez que a baixa concentração de OD é resultado da decomposição da matéria orgânica pelas bactérias (BRASIL, 2009).

A legislação federal (Resolução CONAMA 357/05) e estadual de São Paulo (Decreto n 8468/76), estabelecem a faixa de pH e a quantidade de oxigênio dissolvido (OD) adequado de acordo com a classe de água. Já o Ministério da Saúde (Portaria 518/04) estabelece que o pH da água para abastecimento público deve estar entre 6,0 e 9,5.

A temperatura influencia no crescimento de organismos aquáticos (temperatura ótima), migração, desova e incubação de ovo. Além disso, a temperatura influencia na quantidade de estrógenos livres, sendo encontrada maior quantidade destes em temperaturas elevadas (FERNANDEZ et al, 2008). As variações da temperatura podem ocorrer devido ao regime climático e também pode ocorrer a sua elevação por despejos industriais (BRASIL, 2009).

As coletas foram realizadas em triplicata, em volumes de 1L e armazenadas em frascos de vidro âmbar com tampas de teflon. Foram adicionadas a estas algumas gotas de metanol logo após a coleta, a fim de cessar a atividade microbiana. As amostras foram conservadas a 4°C até análise, que se procedeu no máximo em uma semana após a coleta. As amostras foram filtradas em membrana 0,45µm para retirar as partículas em suspensão, realizando-se após extração por SPE e análise dos hormônios por HPLC com detector de fluorescência (FLU) e detector de arranjo de diodo (DAD).

4.4. Análise de VTG (vitelogenina)

A captura de peixes foi realizada em setembro, nos pontos 1 e 5, devido à necessidade de autorização do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), da Prefeitura de São José do Rio Preto e da Polícia Ambiental. No ponto 1 foram capturados 10 exemplares, sendo três carás (*Geophagus brasiliensis*, Figura 10) machos e uma fêmea, duas tilápias rendali (*Tilapia rendalli*, Figura 11) machos e duas fêmeas, um zoiúdo (*Satanoperca papaterra*, Figura 12) macho e um fêmea. Já no ponto 5 foram capturados 10 exemplares, sendo cinco carás (*Geophagus brasiliensis*, Figura 10) machos e cinco carás (*Geophagus brasiliensis*, Figura 10) fêmeas.



Figura 10. Cará (*Geophagus brasiliensis*) capturado na Represa Municipal de São José do Rio Preto.



Figura 11. Tilápia rendada (*Tilapia rendalli*) capturada na Represa Municipal de São José do Rio Preto.



Figura 12. Zoiúdo (*Satanoperca papaterra*) capturado na Represa Municipal de São José do Rio Preto.

Primeiramente, anestesiou-se os peixes com benzocaína 250mg L^{-1} para que a extração de sangue não causasse dor (NOGA, 1996). Depois, fez-se a extração de sangue com seringas de 3mL heparizadas com 4000UI mL^{-1} de heparina, a qual foi inserida na veia caudal ou lamelas branquiais. Após isso, fez-se a centrifugação (7000g ; 5min , 15°C) do sangue e coletou-se o plasma (sobrenante) e o conservou em -20°C (TYLER et al, 1999). Os peixes capturados foram submetidos à eutanásia pelo deslocamento da cervical.

Após esses procedimentos fez-se o teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) que consiste nas seguintes etapas:

Primeira etapa:

A placa foi revestida com anticorpo de captura, depois adicionou-se $100\mu\text{L}$ de amostra para cada poço e incubou-se por 1 hora em temperatura ambiente.

Segunda etapa:

Lavou-se a placa por três vezes com $300\mu\text{L}$ de tampão PBS (Phosphate buffered saline), 0,05% Tween-20, adicionou-se $100\mu\text{L}$ de anticorpo de detecção, e incubou-se novamente por 1 hora em temperatura ambiente.

Terceira etapa:

Lavou-se a placa por três vezes com 300µL de tampão PBS, 0,05% Tween-20, adicionou-se 100µL de anticorpo secundário, e incubou-se novamente por 1 hora em temperatura ambiente.

Quarta etapa:

Lavou-se a placa cinco vezes com 300µL de tampão PBS, 0,05% Tween-20, adicionou-se 100µL de solução contendo substrato crômico (Peróxido de uréia, OPD), incubou-se por 30 minutos ao abrigo de luz em temperatura ambiente e adicionou-se 50µL de H₂SO₄ 2M para parar a reação. Esperou-se cinco minutos e leu-se a absorvância em 492nm com a leitora de microplaca Elisa TP-READER (Thermo Plate).

A concentração de VTG (vitelogenina) nas amostras foram determinadas usando-se o cálculo recomendado pelo kit de ELISA. Para isso, fez-se diferentes concentrações de vitelogenina para obter uma análise de regressão linear (absorbância x concentração de VTG), com a equação obtida pela mesma e a leitura de absorbância das amostras é possível chegar à concentração de VTG nas amostras. As amostras foram feitas em duplicatas, sendo uma amostra sem diluição e outra com diluição (machos 1:500 e fêmeas 1:1 800 000).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Condições Cromatográficas para a análise de hormônios na água da Represa Municipal de São José do Rio Preto (SP)

Os comprimentos de onda para as condições cromatográficas foram definidos de acordo com a máxima absorção ou fluorescência de cada hormônio estudado. O

levonorgestrel tem a sua absorção máxima em 240nm como demonstrado no espectro na região do UV (Figura 13), portanto utilizou-se o detector de arranjo de diodo (DAD) no referido comprimento de onda, o levonorgestrel não fluoresce por isso não foi analisado pelo detector de fluorescência (FLU).

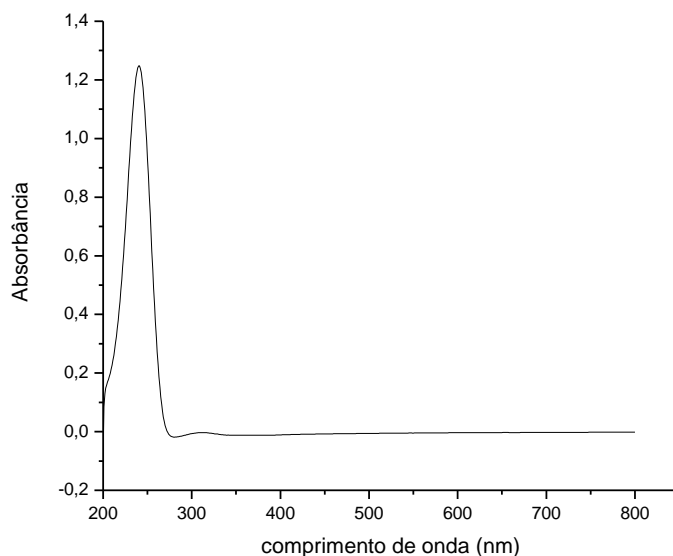


Figura 13. Espectro de UV do levonorgestrel.

Os comprimentos de onda utilizados para a análise do 17 α -etinilestradiol foram definidos de acordo com os resultados do espectro de varredura na região do UV de 200 a 800nm (Figura 14). Verifica-se pelo espectro (Figura 14) que há maior absorbância na região de 200 a 300nm, portanto o 17 α -etinilestradiol foi analisado empregando-se fluorímetro por excitação na faixa de 200 a 300nm (Figura 15). Este espectro demonstrou melhor resultado em 230 e em 280nm, e estes comprimentos de onda foram empregados para a análise do referido hormônio. O espectro de emissão foi obtido pelo fluorímetro na faixa de 300 a 550nm (Figura 16) e apresentou a melhor resposta em 306nm, sendo este comprimento de onda utilizado para a análise do 17 α -etinilestradiol em HPLC/FLU.

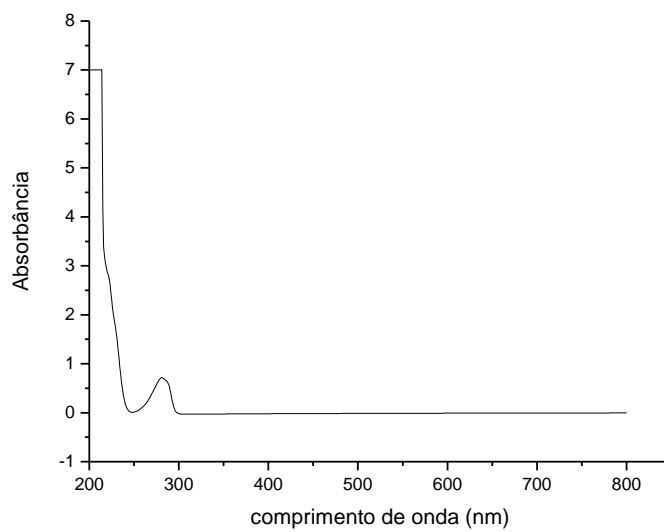


Figura 14. Espectro de UV do 17 α -etinilestradiol.

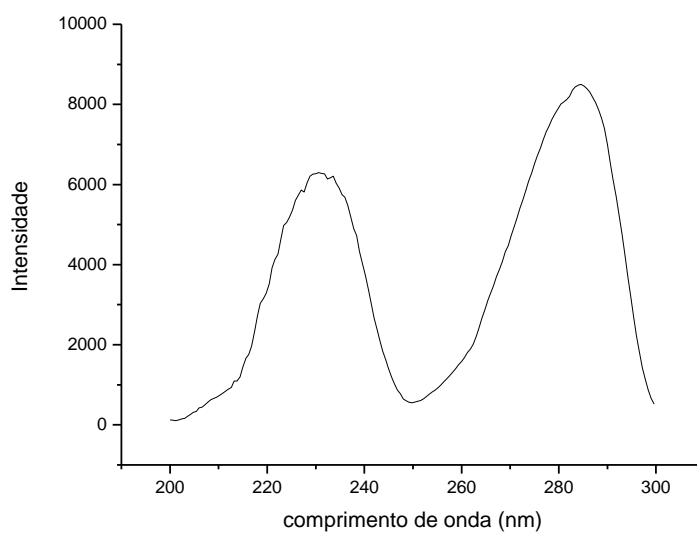


Figura 15. Espectro de excitação do 17 α -etinilestradiol obtido no fluorímetro.

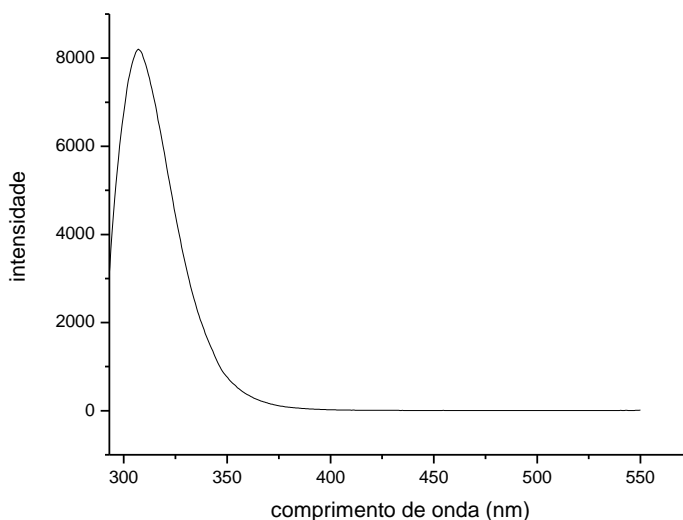


Figura 16. Espectro de emissão do 17α -etinilestradiol obtido no fluorímetro.

Verifica-se pelo espectro de varredura na região do UV de 200 a 800nm (Figura 17) que o 17β -estradiol apresenta melhor absorbância na região de 200 a 300nm e, portanto, o 17β -estradiol foi analisado por excitação no fluorímetro na faixa do comprimento de onda de 200 a 300nm (Figura 18). Verificou-se pelo espectro de excitação (Figura 18) que a melhor resposta foi em 230 e em 280nm. O espectro de emissão obtido pelo fluorímetro na faixa de 300 a 550nm (Figura 19) apresentou melhor resultado em 306nm.

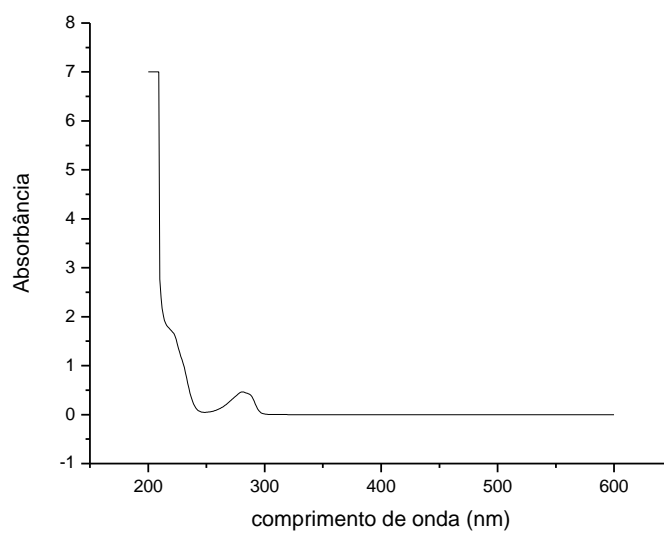


Figura 17. Espectro de UV do 17β-estradiol.

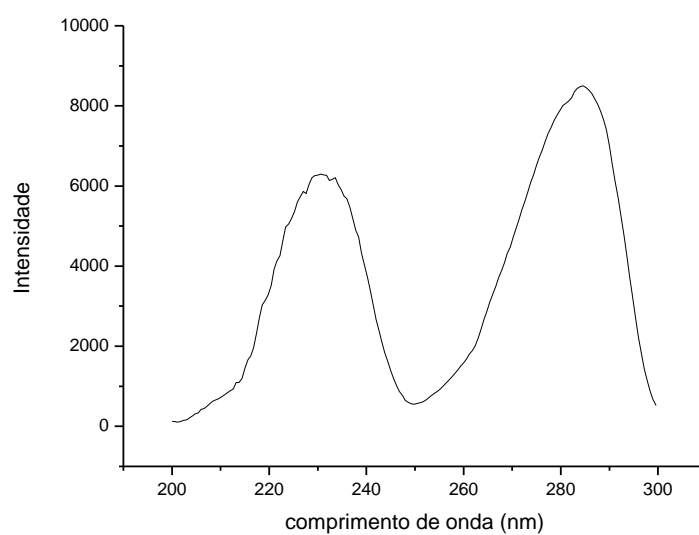


Figura 18. Espectro de excitação do 17β-estradiol obtido no fluorímetro.

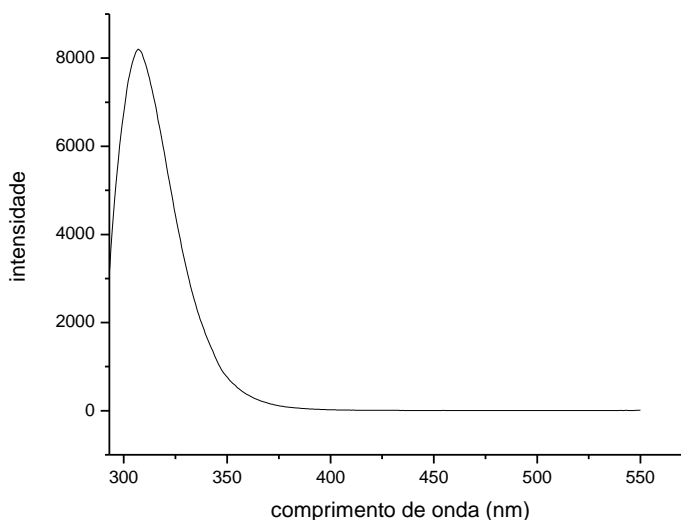


Figura 19. Espectro de emissão do 17 β -estradiol obtido no fluorímetro.

A fase móvel utilizada para a análise dos hormônios levonorgestrel e 17 α -etinilestradiol foi acetonitrila e água livre de orgânicos (50:50) método de LOPES (2007), para o 17 β -estradiol a fase móvel foi acetonitrila e água livre de orgânicos na proporção de 60:40, pois nesta condição obteve-se melhor resposta (Figura 20). As diferentes proporções da fase móvel é explicada pelas diferentes colunas utilizadas, sendo usada a coluna com o adsorvente C-18 (Zorbax SB 4,6 x 250mm, 5 μ m, Agilent Technologies[®]) para o 17 α -etinilestradiol e levonorgestrel, e para o 17 β -estradiol foi utilizada a coluna PAH (LiChrospher PAH, 250 x 4,6 mm , 5 μ m, Agilent Technologies[®]). Isto foi necessário porque o 17 β -estradiol não apresenta reprodutibilidade quando se usa a coluna contendo o adsorvente C-18 (Zorbax SB 4,6 x 250mm, 5 μ m, Agilent Technologies[®]).

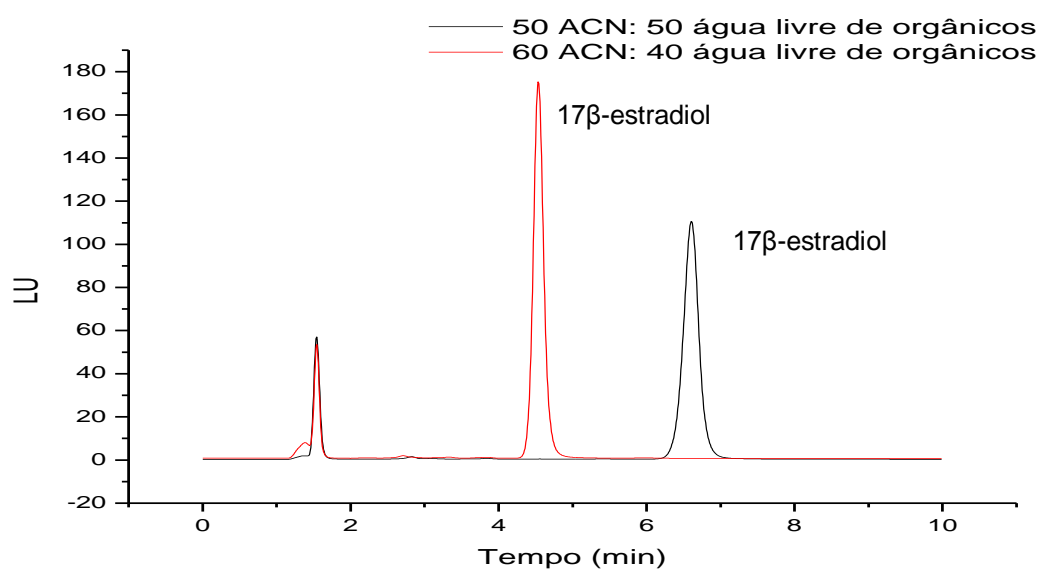


Figura 20. Espectro de comparação para fase móvel para 17β-estradiol.

Comparando-se os comprimentos de onda de excitação em 230 e em 280nm no detector de fluorescência para os hormônios 17α-etinilestradiol e 17β-estradiol, o primeiro comprimento de onda apresentou melhor resposta e isso pode ser visualizado na Figura 21.

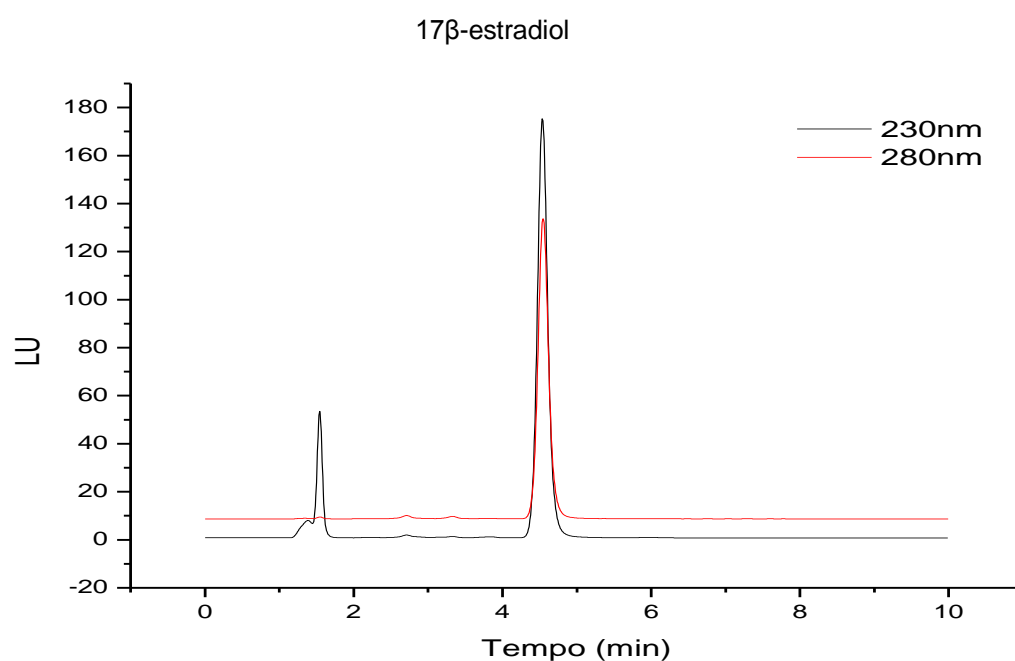


Figura 21. Espectro de comparação entre 230 e 280nm no HPLC/FLU para 17β-estradiol.

Como foram feitos vários testes para se encontrar a melhor condição cromatográfica, descritos anteriormente, optou-se por utilizar para a análise do levonorgestrel HPLC/DAD o comprimento de onda de 240nm, fase móvel isocrática de acetonitrila e água livre de orgânicos (50:50) e corrida de 25 minutos. Para a análise do 17 α -etinilestradiol e do 17 β -estradiol foi utilizado HPLC/FLU com excitação em 230nm e emissão em 306nm, fase móvel isocrática de acetonitrila e água livre de orgânicos (50:50 e 60:40, respectivamente) e corrida de dez minutos.

5.2. Comparação dos métodos de extração por SPE de Araújo (2006) e Lopes (2007)

Na comparação dos métodos de Araújo (2006) (Figura 22) e Lopes (2007) (Figura 23), o último se mostrou mais eficiente devido a melhor resposta no cromatograma para as mesmas condições cromatográficas e concentração de 2,5 μgL^{-1} em 100mL de amostra percolada através do cartucho contendo o adsorvente C-18.

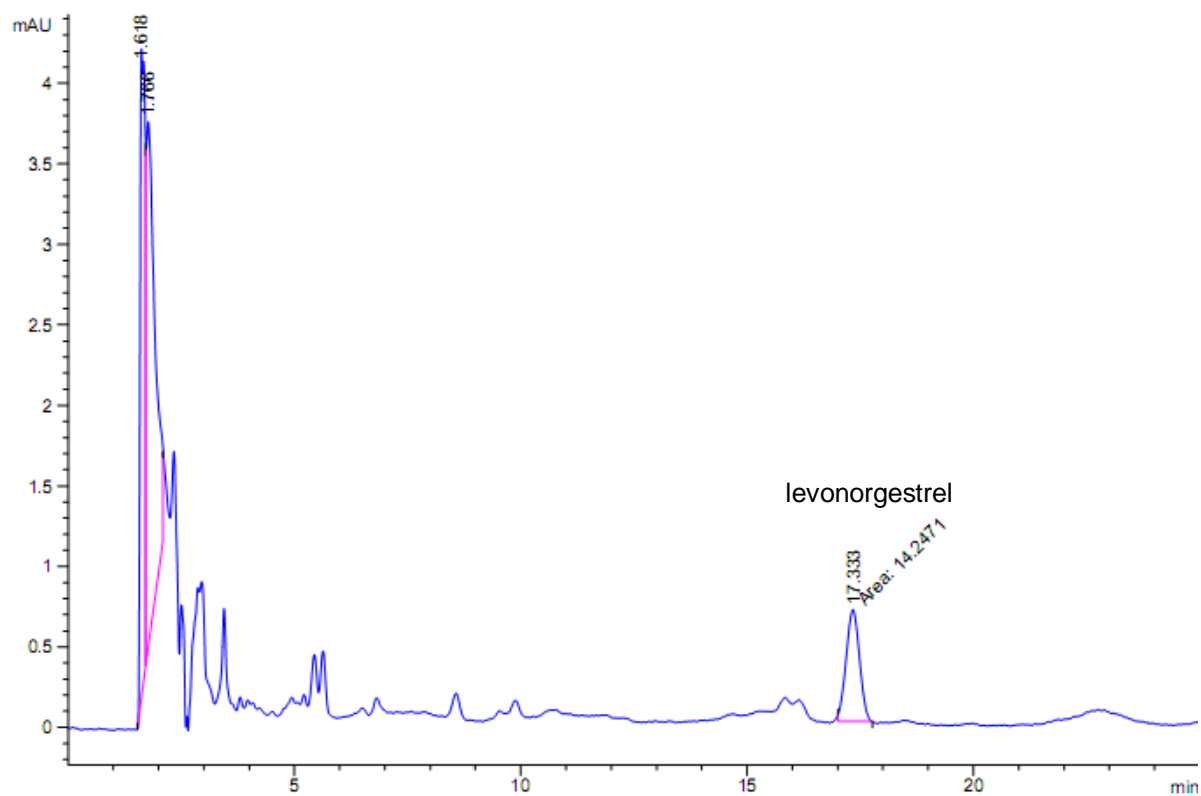


Figura 22. Cromatograma do levonorgestrel na concentração de $2,5\mu\text{gL}^{-1}$, método Araújo (2006).

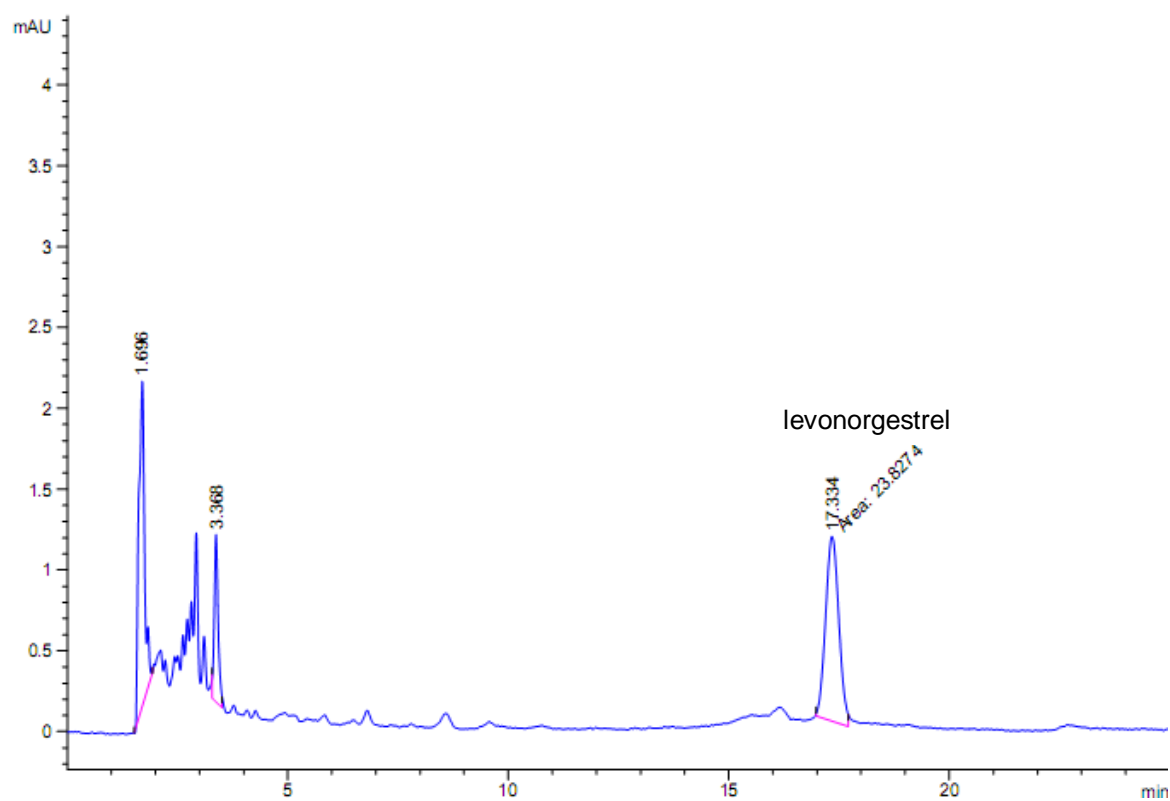


Figura 23. Cromatograma do levonorgestrel na concentração de $2,5\mu\text{gL}^{-1}$, método Lopes (2007).

Fez-se teste em que foram comparados diferentes volumes de amostras, empregando-se o método de extração por SPE (condicionamento, lavagem, eluição e reconstituição) de Lopes (2007), entre 100 e 200mL (Figuras 24 e 25) de amostra percolada através do cartucho contendo o adsorvente C-18. Observou-se que, quando empregou-se 200mL de amostra a resposta foi melhor para a mesma concentração de levonorgestrel, $0,15\mu\text{gL}^{-1}$, pois ao utilizar 100mL de amostra na concentração $0,15\mu\text{gL}^{-1}$ de levonorgestrel não foi observada resposta.

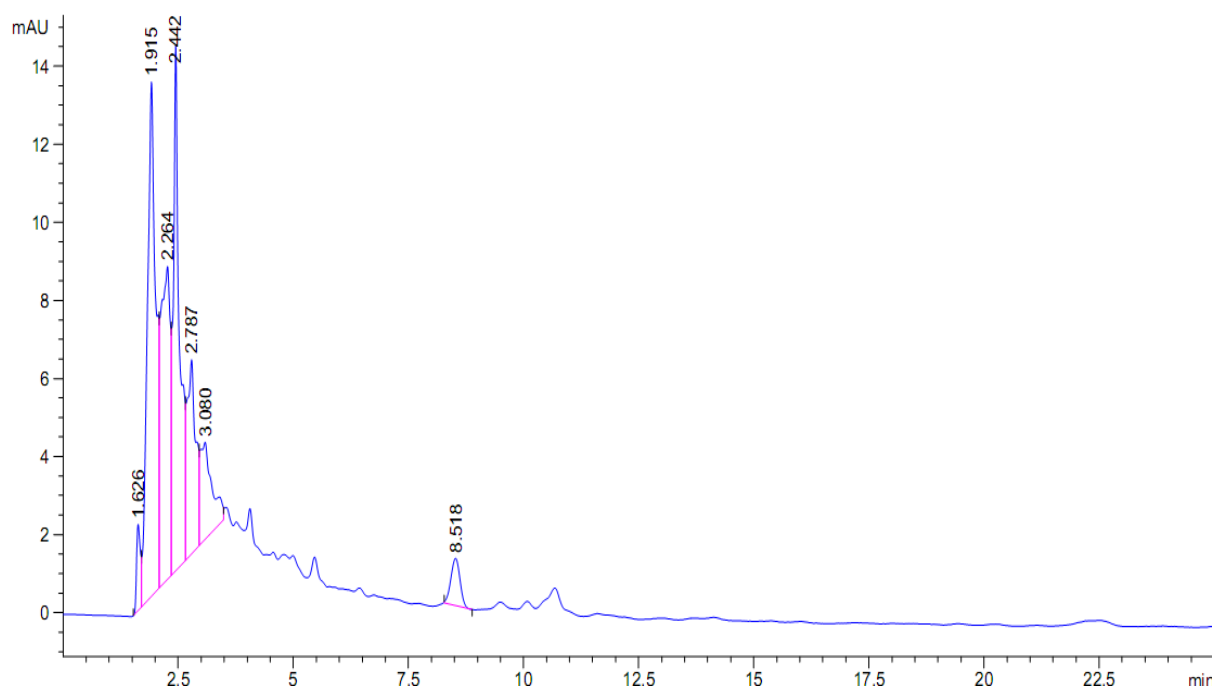


Figura 24. Cromatograma de 100mL para a concentração de $0,15\mu\text{gL}^{-1}$ de levonorgestrel, extraída por SPE pelo método Lopes (2007).

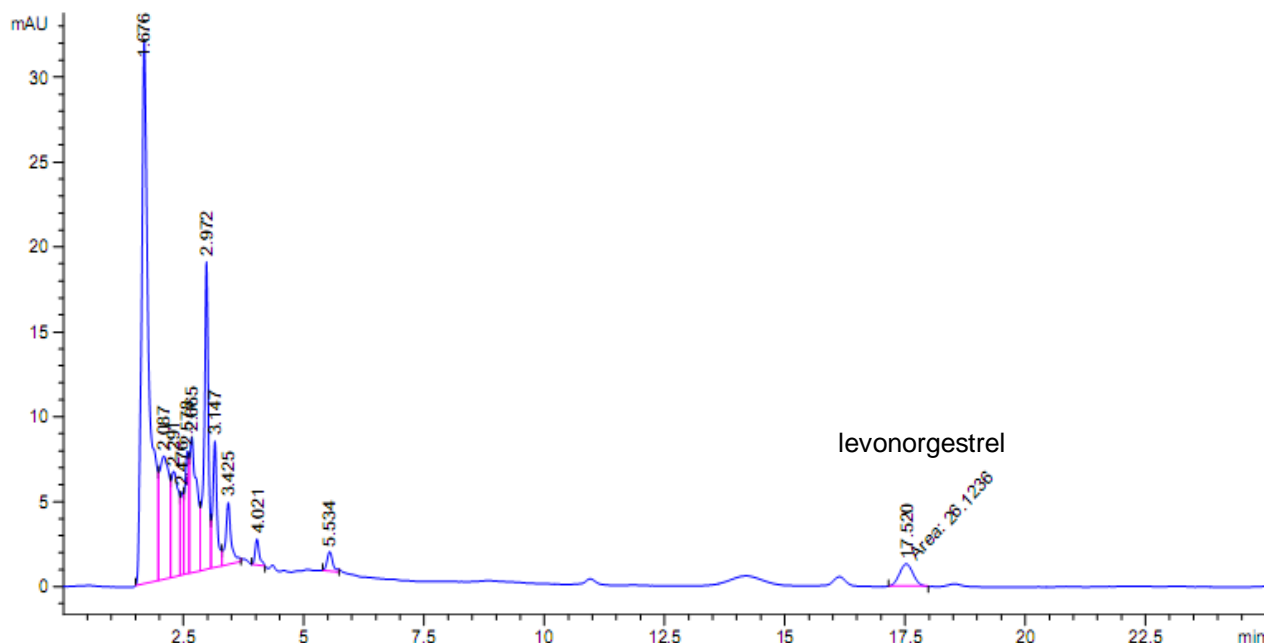


Figura 25. Cromatograma de 200mL para a concentração de $0,15\mu\text{gL}^{-1}$ de levonorgestrel, extraída por SPE pelo método Lopes (2007).

Devido aos melhores resultados apresentados quando utilizou-se 200mL de amostra (Figura 25), utilizou-se esse volume para validar o método.

5.3. Validação do método para a análise dos hormônios em estudo

Os parâmetros utilizados para a validação do método foram seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), limite inferior de quantificação (LIQ), linearidade, precisão e exatidão intra-corrída e inter-corrída e por último recuperação.

5.3.1. Seletividade

Nessa etapa foi analisada uma amostra do branco, ou seja, a matriz sem o analito e uma amostra com o analito, ou seja, água livre de orgânicos com o analito, ambos foram submetidas às mesmas condições cromatográficas (Figuras 26 a 28). Utilizou-se estas duas amostras para comprovar que na amostra do branco não há interferentes provenientes da matriz que têm tempo de retenção próximo ao do

analito, o que pode resultar em falsos positivos ou negativos. A água livre de orgânicos é considerada isenta destes interferentes.

Para comprovar a seletividade do método para a análise do 17α – etinilestradiol (Figura 26) foi filtrada a água de nascente e posteriormente foi feita a extração da mesma por SPE. Fez-se também uma amostra de 200mL diluindo a solução estoque na concentração de 100mgL^{-1} do hormônio em água livre de orgânicos até obter a concentração de $40\mu\text{gL}^{-1}$, que foi extraída por SPE. Os extratos foram então submetidos à análise empregando-se HPLC/FLU. O mesmo procedimento foi feito para o 17β -estradiol para demonstrar a seletividade (Figura 27).

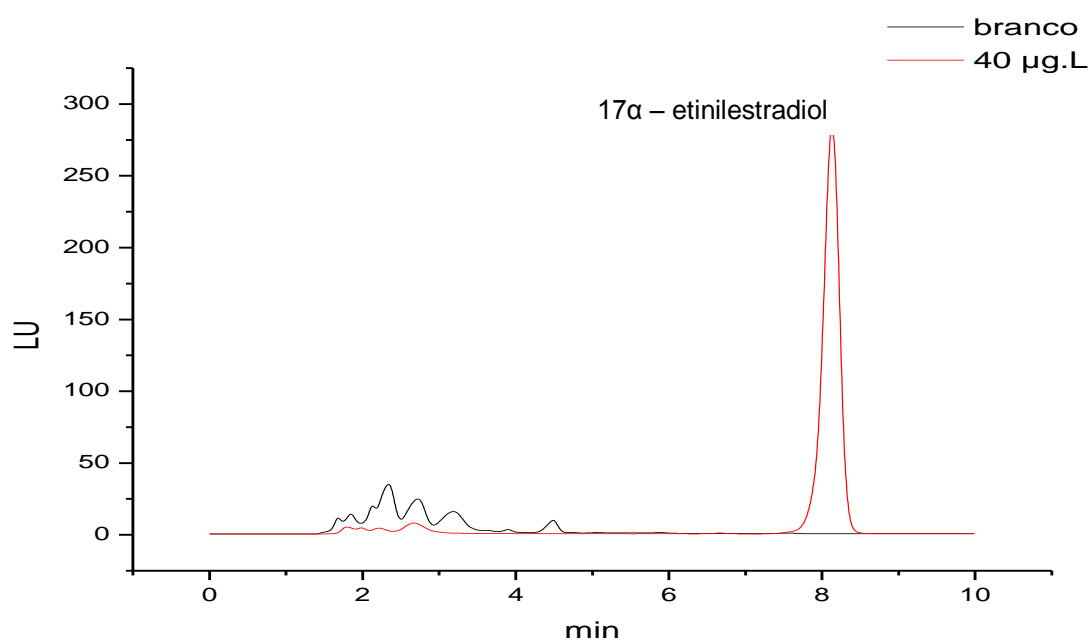


Figura 26. Seletividade do método para a análise do 17α –etinilestradiol (tempo de retenção de 8,19 min).

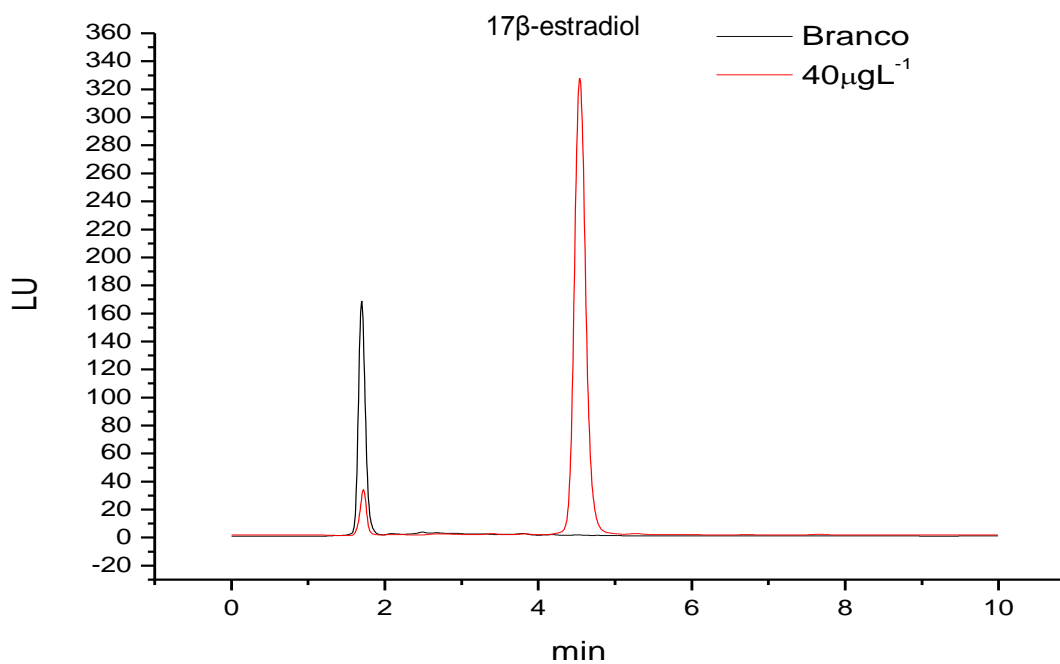


Figura 27. Seletividade do método para a análise do 17β-estradiol (tempo de retenção de 4,59 min).

A seletividade do método para a análise do levonorgestrel (Figura 28) foi demonstrada com a análise de uma amostra de água de nascente filtrada, que foi extraída por SPE, e também com a análise de uma amostra diluindo-se a solução estoque na concentração de 100mgL⁻¹ do levonorgestrel em água livre de orgânicos até resultar na concentração de 100µgL⁻¹ e no volume final de 200mL, logo após fez-se a extração por SPE. Os extratos foram analisadas por HPLC/DAD.

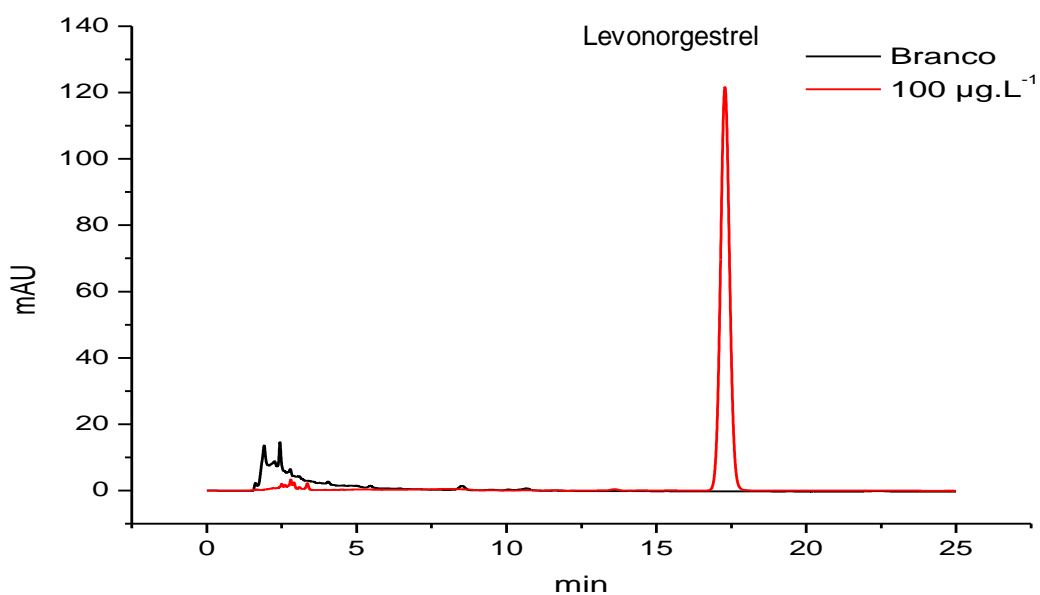


Figura 28. Seletividade do método para o levonorgestrel (tempo de retenção de 17,41 min).

Verifica-se pelos cromatogramas das Figuras 26 a 28, anteriormente apresentados sobre a seletividade do método de análise dos hormônios 17α -etinilestradiol, 17β -estradiol e levonorgestrel, que o método utilizado para detectar os hormônios em estudos é adequado para se fazer a validação. Pois, verifica-se pelos cromatogramas que não há picos próximos ao tempo de retenção do analito que é de 8,19 min para o 17α -etinilestradiol; 4,59 min para o 17β -estradiol e de 17,41 min para o levonorgestrel. Isto quer dizer, que o método de detecção dessas substâncias não apresenta falso positivo ou falso negativo.

5.3.2. Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Segundo a RE- 899 de 2003 da ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008) o limite de detecção deve ser de duas a três vezes maior que o ruído, já o limite de quantificação deve ser no mínimo cinco vezes maior que o ruído e também deve ter precisão e exatidão dentro dos limites aceitáveis, ou seja, precisão de até 20% e exatidão de 80 a 120%.

As amostras foram preparadas diluindo-se a solução estoque preparada com água de nascente filtrada, com posterior extração em SPE e análise por HPLC. As soluções analisadas foram na concentração de 25; 50; 100; 150ngL⁻¹ para o 17 α – etinilestradiol, 17 β – estradiol e para o levonorgestrel.

O limite de detecção e de quantificação (Tabela 7) do método para cada hormônio demonstraram-se adequados, quando comparados com a concentração de hormônios encontrada em amostra de água de estudos feitos por outros autores (Tabela 2) Ghiselli (2006), Raimundo (2007) e Moura (2009).

Tabela 7. Limite de detecção e de quantificação do método para a análise de hormônio em água; volume de injeção: 20 μ L.

| Hormônio | LD (ngL ⁻¹) | LQ (ngL ⁻¹) |
|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 17 α – etinilestradiol | 25 | 100 |
| 17 β – estradiol | 100 | 150 |
| Levonorgestrel | 50 | 150 |

5.3.3. Limite inferior de quantificação (LIQ)

Preparou-se cinco amostras diferentes com a mesma concentração para cada hormônio, sendo utilizada a concentração encontrada para o LQ, ou seja, cinco amostras de 100ngL⁻¹ do 17 α – etinilestradiol, cinco amostras de 150ngL⁻¹ do 17 β – estradiol e cinco amostras de 150ngL⁻¹ do levonorgestrel. Todas as amostras foram preparadas diluindo-se a solução estoque preparada com água de nascente filtrada, com extração e análise por HPLC.

Como as amostras dos hormônios estudados apresentaram precisão menor que 20% e exatidão entre 80 a 120%, portanto a concentração referente ao limite de quantificação (LQ) é considerada como limite inferior de quantificação (LIQ) (Tabela 8).

Tabela 8. Precisão e exatidão do limite de quantificação.

| Hormônio | LIQ (ngL ⁻¹) | DPR (%) | Exatidão (%) |
|-------------------------------|--------------------------|---------|--------------|
| 17 α – etinilestradiol | 100 | 5,49 | 105,32 |
| 17 β – estradiol | 150 | 5,24 | 113,81 |
| Levonorgestrel | 150 | 7,91 | 88,64 |

5.3.4. Linearidade

Para cada curva foram feitas seis concentrações diferentes e para cada concentração foi analisada em triplicata. A seguir serão apresentados os resultados obtidos para cada hormônio estudado.

17 α -etinilestradiol

As soluções utilizadas do 17 α -etinilestradiol foram: para a primeira curva na concentração de 0,10; 0,20; 0,40; 0,60; 0,80 e 1,0 μ gL⁻¹ (Figura 29); para a segunda curva 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 μ gL⁻¹ (Figura 30); para a curva mais alta foram de 10,0; 15,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 μ gL⁻¹ (Figura 31).

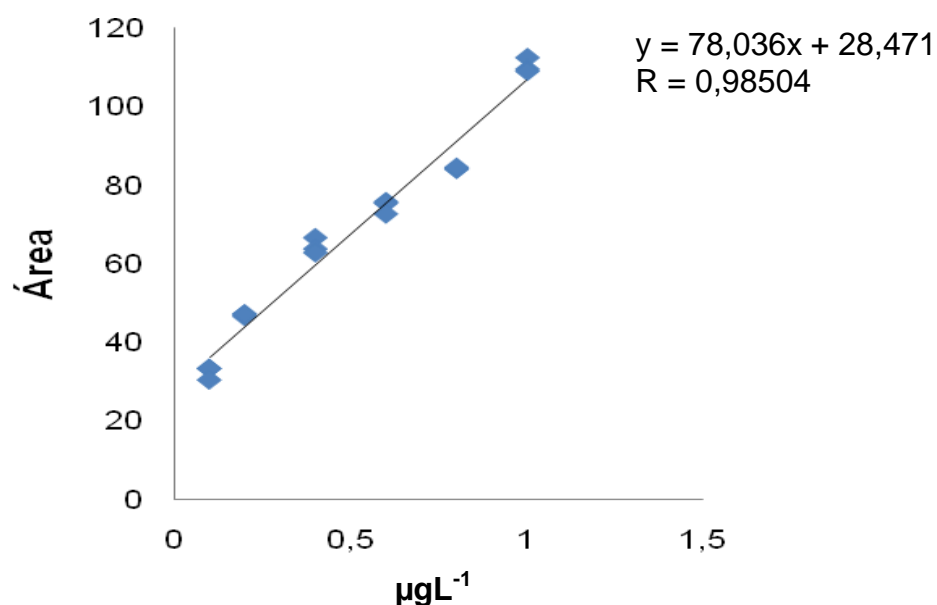


Figura 29. Linearidade do método para a análise do 17 α -etinilestradiol na concentração de 0,10 a 1,0 μ gL⁻¹.

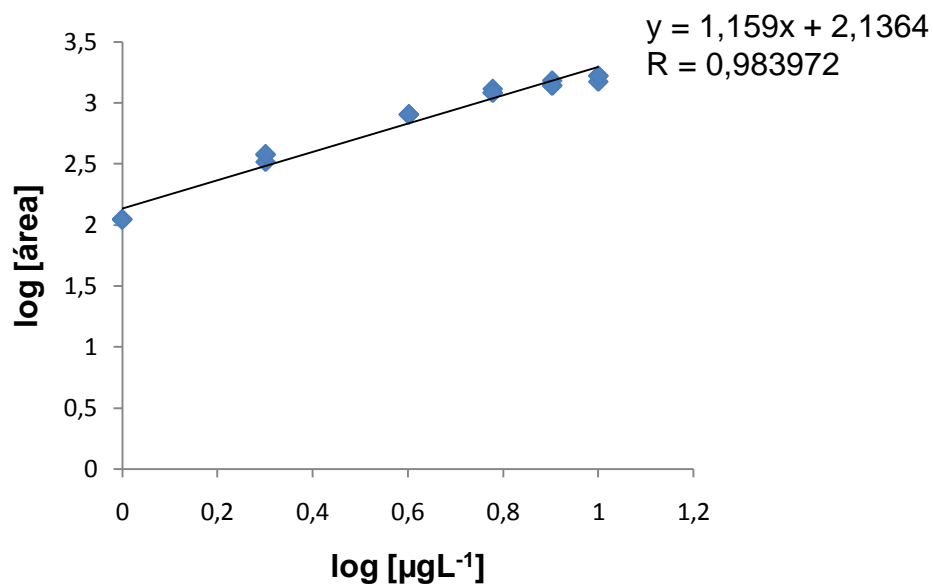


Figura 30. Linearidade do método para a análise do 17 α -etinilestradiol na concentração de 1,0 a 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$

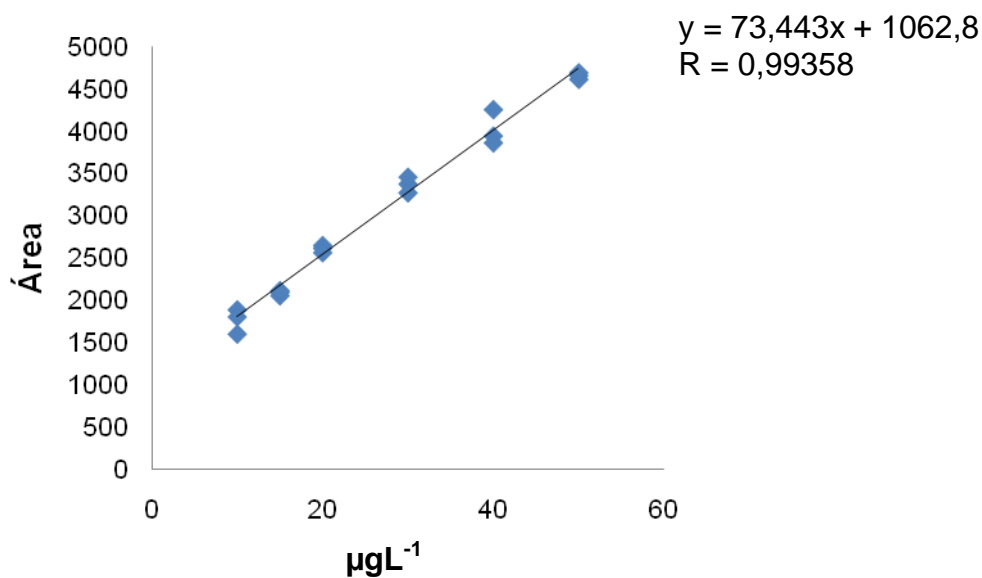


Figura 31. Linearidade do método para a análise do 17 α -etinilestradiol na concentração de 10,0 a 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$

17 β -estradiol

As soluções do 17 β -estradiol com diferentes concentrações utilizadas para a curva analítica na concentração baixa foram 0,15; 0,50; 1,50; 3,0; 4,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$

(Figura 32). Para a curva analítica de concentração alta utilizou-se 5,0; 7,0; 14,0; 21,0; 28,0; 35,0 e 42,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 33).

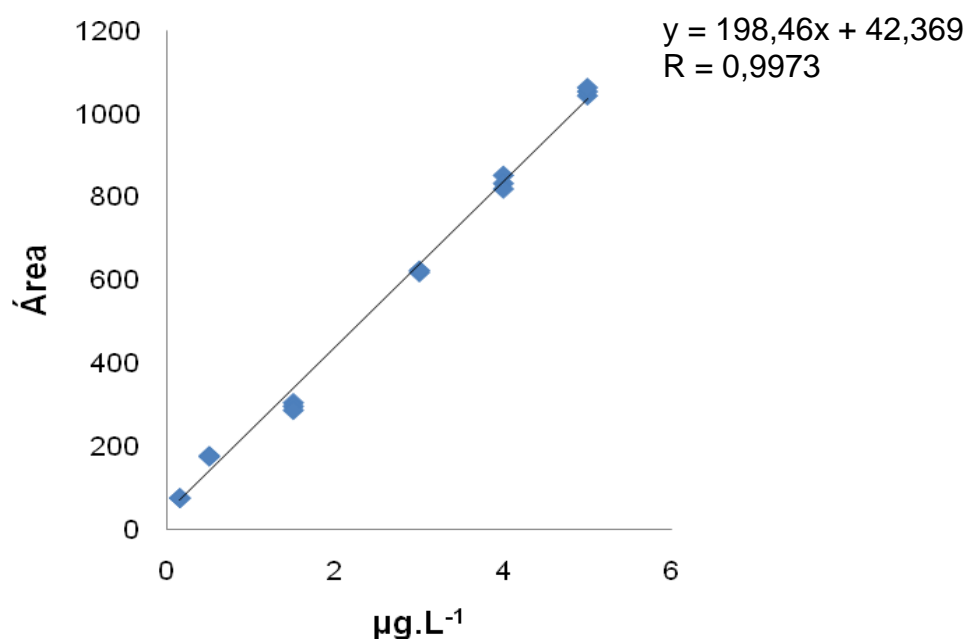


Figura 32. Linearidade do método para a análise do 17 β -estradiol na concentração de 0,15 a 5,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$

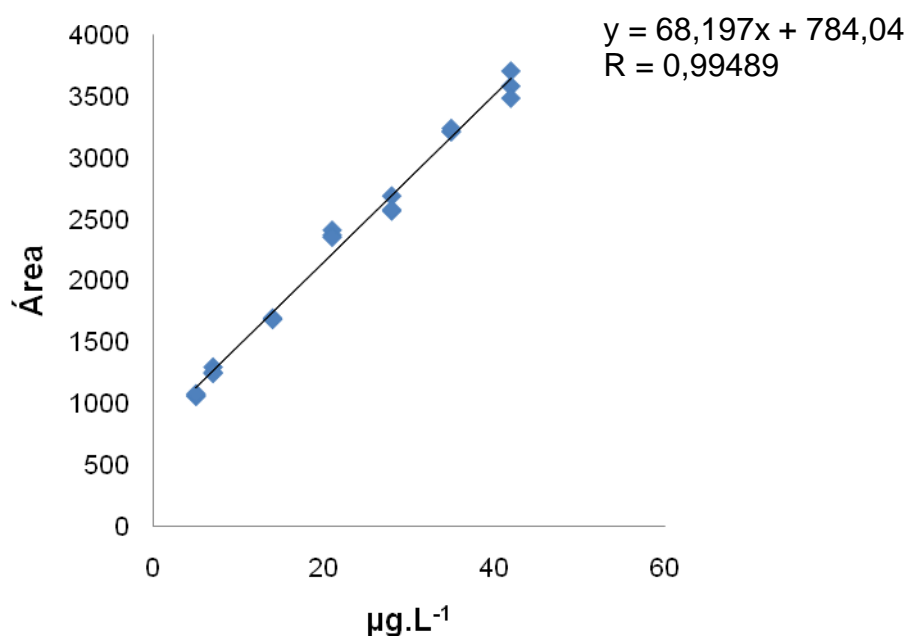


Figura 33. Linearidade do método para a análise do 17 β -estradiol na concentração de 5,0 a 42 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Levonorgestrel

Para determinar a linearidade do método para a análise do levonorgestrel foram utilizadas as seguintes soluções para curva analítica baixa na concentração de 0,15; 0,50; 1,0; 3,0; 6,0 e 10,0 μgL^{-1} (Figura 34). Para a curva analítica alta utilizou-se a concentração de 10,0; 70,0; 140,0; 210,0; 280,0 e 360,0 μgL^{-1} (Figura 35).

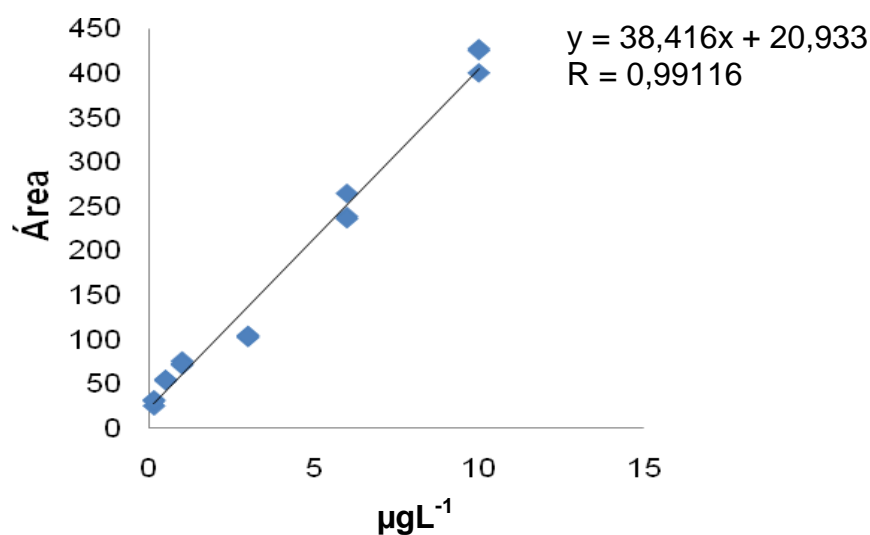


Figura 34. Linearidade do método para a análise do levonorgestrel na concentração de 0,15 a 10,0 μgL^{-1} .

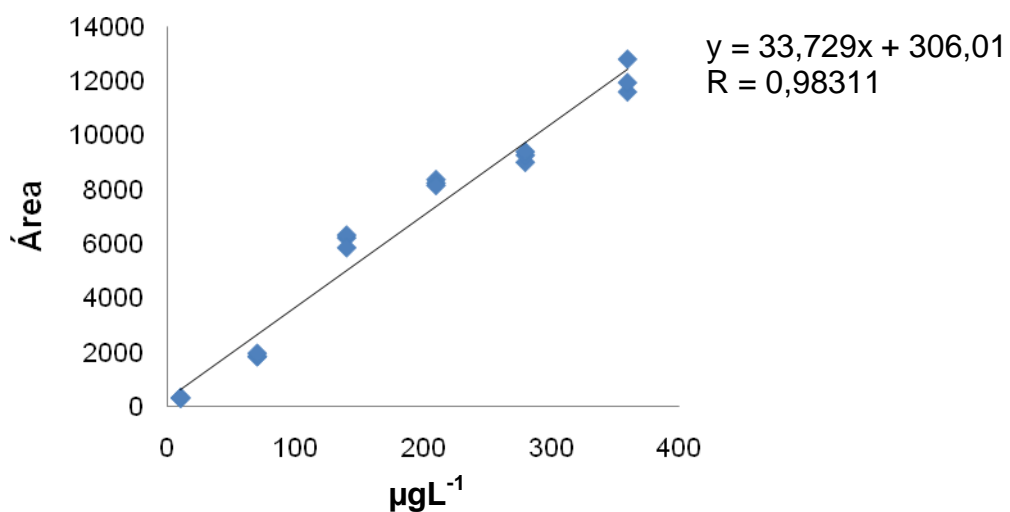


Figura 35. Linearidade do método para a análise do levonorgestrel na concentração de 10,0 a 360,0 μgL^{-1} .

A primeira curva analítica do 17 α -etinilestradiol, 17 β -estradiol e levonorgestrel apresentou LIQ com desvio de até 20% comparada com a concentração nominal e as outras soluções com diferentes concentrações desvio de até 15% em relação à concentração nominal. Todas as outras curvas analíticas apresentaram desvio de até 15% para todas as soluções estudadas comparando-se com a concentração nominal. Os coeficientes de correlação linear das curvas também estão dentro dos parâmetros, ou seja, são superiores a 0,98.

Os resultados encontrados da linearidade de resposta para cada hormônio em estudo servem para determinar a concentração dos mesmos em água, ou seja, com a equação da reta obtida pela linearidade e com a área determinada por análise em HPLC dos hormônios, consegue-se saber qual é a concentração dessas substâncias em água.

5.3.5. Precisão e exatidão

Para determinar a precisão e a exatidão do método (Tabelas 9 a 14) para cada hormônio fortificou-se cinco amostras isentas do analito abrangendo as concentrações baixa, média e alta, sendo que para cada concentração preparou-se cinco amostras. Esse procedimento foi feito em dois dias diferentes.

Tabela 9. Precisão e exatidão do método do primeiro dia de análise do 17 α -etinilestradiol.

| μgL^{-1} | DPR* (%) | Exatidão (%) |
|---------------------|----------|--------------|
| 0,1 | 6,36 | 96,50 |
| 1,0 | 0,30 | 89,83 |
| 10,0 | 2,03 | 98,42 |
| 20,0 | 3,33 | 115,48 |
| 40,0 | 4,66 | 104,16 |

*Desvio padrão relativo ou precisão.

Tabela 10. Precisão e exatidão do método do segundo dia de análise do 17 α -etinilestradiol.

| μgL^{-1} | DPR* (%) | Exatidão (%) |
|---------------------|----------|--------------|
| 0,1 | 9,02 | 89,35 |
| 1,0 | 2,73 | 87,00 |
| 10,0 | 1,17 | 97,20 |
| 20,0 | 1,26 | 110,62 |
| 40,0 | 1,47 | 116,73 |

*Desvio padrão relativo ou precisão.

Tabela 11. Precisão e exatidão do método do primeiro dia de análise do 17 β -estradiol.

| μgL^{-1} | DPR* (%) | Exatidão (%) |
|---------------------|----------|--------------|
| 0,15 | 4,09 | 108,42 |
| 5,0 | 1,41 | 100,00 |
| 20,0 | 5,51 | 113,65 |
| 35,0 | 2,56 | 108,65 |

*Desvio padrão relativo ou precisão.

Tabela 12. Precisão e exatidão do método do segundo dia de análise do 17 β -estradiol.

| μgL^{-1} | DPR* (%) | Exatidão (%) |
|---------------------|----------|--------------|
| 0,15 | 6,69 | 110,11 |
| 5,0 | 1,92 | 105,98 |
| 20,0 | 4,66 | 87,41 |
| 35,0 | 0,57 | 115,07 |

*Desvio padrão relativo ou precisão.

Tabela 13. Precisão e exatidão do método do primeiro dia de análise do levonorgestrel.

| μgL^{-1} | DPR (%) | Exatidão (%) |
|---------------------|---------|--------------|
| 0,15 | 1,92 | 114,36 |
| 10 | 0,73 | 104,70 |
| 150 | 4,48 | 111,80 |
| 300 | 14,69 | 88,34 |

*Desvio padrão relativo ou precisão.

Tabela 14. Precisão e exatidão do método do segundo dia de análise do levonorgestrel.

| μgL^{-1} | DPR (%) | Exatidão (%) |
|---------------------|---------|--------------|
| 0,15 | 2,64 | 117,09 |
| 10 | 0,32 | 107,45 |
| 150 | 0,44 | 93,69 |
| 300 | 2,61 | 103,74 |

*Desvio padrão relativo ou precisão.

Verifica-se pelos resultados apresentados nas Tabelas 9 a 14 que todas as soluções com concentração diferente apresentaram precisão (DPR) ou desvio

padrão relativo (DPR) de até 15%, portanto estão dentro do parâmetro da Resolução RE-899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008). A exatidão de todas as soluções com diferentes concentrações também está de acordo com a norma Resolução RE-899 da ANVISA que é de 80 a 120%. Os resultados da precisão e da exatidão interdias do método para análise dos hormônios estudados estão dentro da norma e estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Precisão e exatidão interdias do método dos hormônios estudados.

| Hormônio | DPR* (%) | Exatidão (%) |
|------------------------------|-----------------|---------------------|
| 17 α -etinilestradiol | 3,23 | 100,53 |
| 17 β -estradiol | 3,43 | 106,16 |
| Levonorgestrel | 3,48 | 105,15 |

*Desvio padrão relativo ou precisão.

5.3.6. Recuperação

Para saber a eficiência da extração dos hormônios em estudo por SPE (extração por fase sólida) fez-se diferentes soluções com concentração baixa, média e alta da linearidade do método, com três repetições para cada amostra. As soluções foram submetidas a extração por SPE e analisadas por HPLC/FLU/DAD. Além disso, foram preparadas estas mesmas soluções com concentração baixa, média e alta, com três repetições cada, sem extração por SPE, ou seja, as amostras foram analisadas diretamente por HPLC/FLU/DAD.

Os resultados obtidos das análises das amostras fortificadas com extração por SPE e sem extração foram precisos e exatos. A partir desses dados foram feitos os cálculos para determinar a porcentagem de recuperação (Tabelas 16 a 18) do método. Os cálculos foram feitos em relação à área do pico referente ao analito contido na amostra submetida à extração por SPE e a sem extração.

Tabela 16. Recuperação do método de extração por SPE do 17 α -etinilestradiol.

| μgL^{-1} | Recuperação (%) |
|---------------------|-----------------|
| 0,1 | 84,34 |
| 1,0 | 87,32 |
| 10,0 | 87,01 |
| 20,0 | 87,62 |
| 40,0 | 103,46 |

Tabela 17. Recuperação do método de extração por SPE do 17 β -estradiol.

| μgL^{-1} | Recuperação (%) |
|---------------------|-----------------|
| 0,15 | 83,69 |
| 5,0 | 96,41 |
| 20,0 | 88,60 |
| 35,0 | 87,48 |

Tabela 18. Recuperação do método de extração por SPE do levonorgestrel.

| μgL^{-1} | Recuperação (%) |
|---------------------|-----------------|
| 0,15 | 83,90 |
| 10,0 | 85,99 |
| 150,0 | 94,84 |
| 300,0 | 81,06 |

Após a validação do método fez-se as coletas das amostras de água da Represa Municipal de São José do Rio Preto nos pontos 1 a 6 (Tabela 6) para a análise dos hormônios 17 α -etinilestradiol, 17 β -estradiol e levonorgestrel. Para a análise dos hormônios em estudo utilizou-se o método validado.

5.4. Análise das amostras de água da Represa Municipal de São José do Rio Preto (SP)

Foram feitas quatro coletas de água, distribuídas de acordo com o período de chuva (janeiro e março) e de seca (maio e julho) de um mesmo ano. Considera-se a sazonalidade, pois esta pode causar interferência nos resultados das análises, uma vez que no período chuvoso a concentração de hormônio pode ser mais baixa devido à quantidade de água de chuva que causa diluição. Devido a isso, são demonstrados os índices pluviométricos (Tabelas 19 a 22) dos meses das coletas.

Como a época de chuva coincide com o verão e a época de seca com o inverno serão demonstrados também as temperaturas médias do período de coleta (Figura 36 a 39).

Tabela 19. Índice Pluviométrico do mês de janeiro de 2009 (CENTRO INTEGRADO DE INFORMAÇÕES AGROMETEOROLÓGICAS, 2009).

| Semana | Precipitação (mm) | Armazenamento (mm) | Evapotranspiração Real (mm) | Déficit Hídrico (mm) | Excedente Hídrico (mm) |
|-------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 05/01/2009 a 11/01/2009 | 0,0 | 42 | 15 | 23 | 0 |
| 12/01/2009 a 18/01/2009 | 68,3 | 66 | 44 | 0 | 0 |
| 19/01/2009 a 25/01/2009 | 0,0 | 52 | 14 | 17 | 0 |
| 26/01/2009 a 01/02/2009 | 123,4 | 125 | 31 | 0 | 20 |
| Total | 191,7 | | | | |

Tabela 20. Índice Pluviométrico do mês de março de 2009 (CENTRO INTEGRADO DE INFORMAÇÕES AGROMETEOROLÓGICAS, 2009).

| Semana | Precipitação (mm) | Armazenamento (mm) | Evapotranspiração Real (mm) | Déficit Hídrico (mm) | Excedente Hídrico (mm) |
|-------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 02/03/2009 a 08/03/2009 | 0,0 | 78 | 29 | 10 | 0 |
| 09/03/2009 a 15/03/2009 | 61,4 | 106 | 33 | 0 | 0 |
| 16/03/2009 a 22/03/2009 | 51,4 | 125 | 31 | 0 | 1 |
| 23/03/2009 a 29/03/2009 | 39,0 | 125 | 31 | 0 | 8 |
| 30/03/2009 a 05/04/2009 | 12,6 | 108 | 29 | 2 | 0 |
| Total | 164,4 | | | | |

Tabela 21. Índice Pluviométrico do mês de maio de 2009 (CENTRO INTEGRADO DE INFORMAÇÕES AGROMETEOROLÓGICAS, 2009).

| Semana | Precipitação (mm) | Armazenamento (mm) | Evapotranspiração Real (mm) | Déficit Hídrico (mm) | Excedente Hídrico (mm) |
|-------------------------|-------------------|--------------------|-----------------------------|----------------------|------------------------|
| 04/05/2009 a 10/05/2009 | 0,0 | 76 | 12 | 7 | 0 |
| 11/05/2009 a 17/05/2009 | 26,8 | 84 | 19 | 0 | 0 |
| 18/05/2009 a 24/05/2009 | 0,0 | 74 | 10 | 6 | 0 |
| 25/05/2009 a 31/05/2009 | 0,5 | 63 | 11 | 9 | 0 |
| Total | 27,3 | | | | |

Tabela 22. Índice Pluviométrico do mês de julho de 2009 (CENTRO INTEGRADO DE INFORMAÇÕES AGROMETEOROLÓGICAS, 2009).

| Semana | Precipitação (mm) | Armazenamento (mm) | Evapotranspiração Real (mm) | Déficit Hídrico (mm) | Excedente Hídrico (mm) |
|-------------------------|-------------------|--------------------|-----------------------------|----------------------|------------------------|
| 06/07/2009 a 12/07/2009 | 10,2 | 50 | 12 | 3 | 0 |
| 13/07/2009 a 19/07/2009 | 0,0 | 44 | 6 | 9 | 0 |
| 20/07/2009 a 26/07/2009 | 16,2 | 46 | 14 | 0 | 0 |
| 27/07/2009 a 02/08/2009 | 0,0 | 40 | 6 | 11 | 0 |
| Total | 26,4 | | | | |

Os índices pluviométricos indicaram que no período de janeiro houve um acumulado de 191,7mm de precipitação e de 164,4mm para o mês de março, sendo estes valores menores para o período de seca, na qual fora registrados os índices de 27,3mm para o mês de maio e 26,4mm para o mês de julho. A temperatura média da época de chuva (verão) dos meses de janeiro (Figura 35) e março (Figura 36) foi de 26,07 e 26,82°C, respectivamente, já para a época de seca (inverno) dos meses de maio (Figura 37) e julho (Figura 38) foi de 23,7 e 21,77°C.

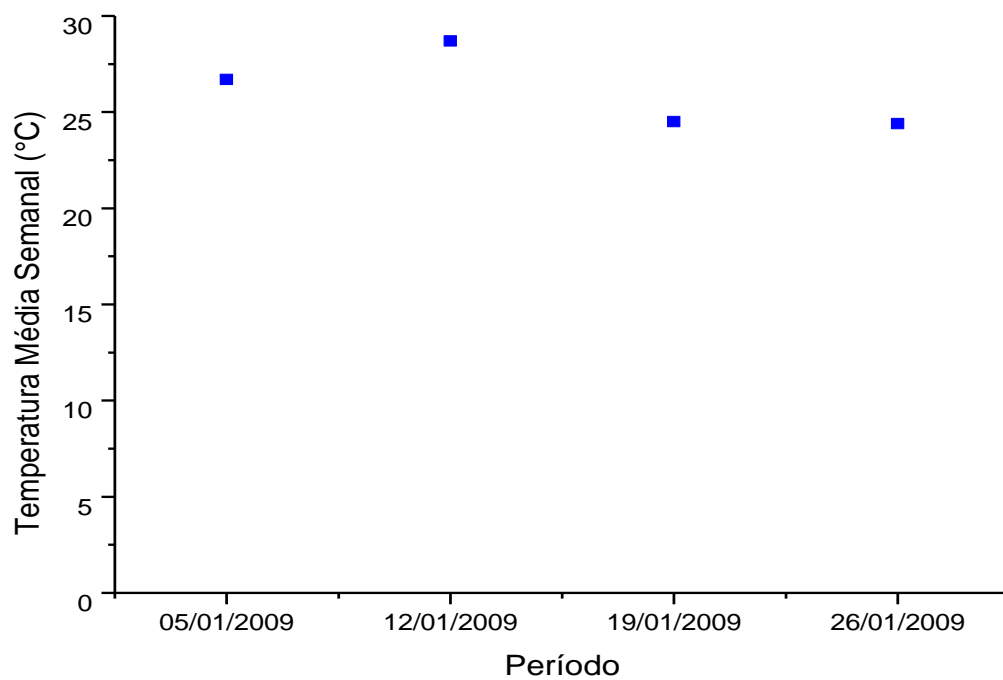


Figura 36. Temperatura média do mês de Janeiro de 2009 (CENTRO INTEGRADO DE INFORMAÇÕES AGROMETEOROLÓGICAS, 2009).

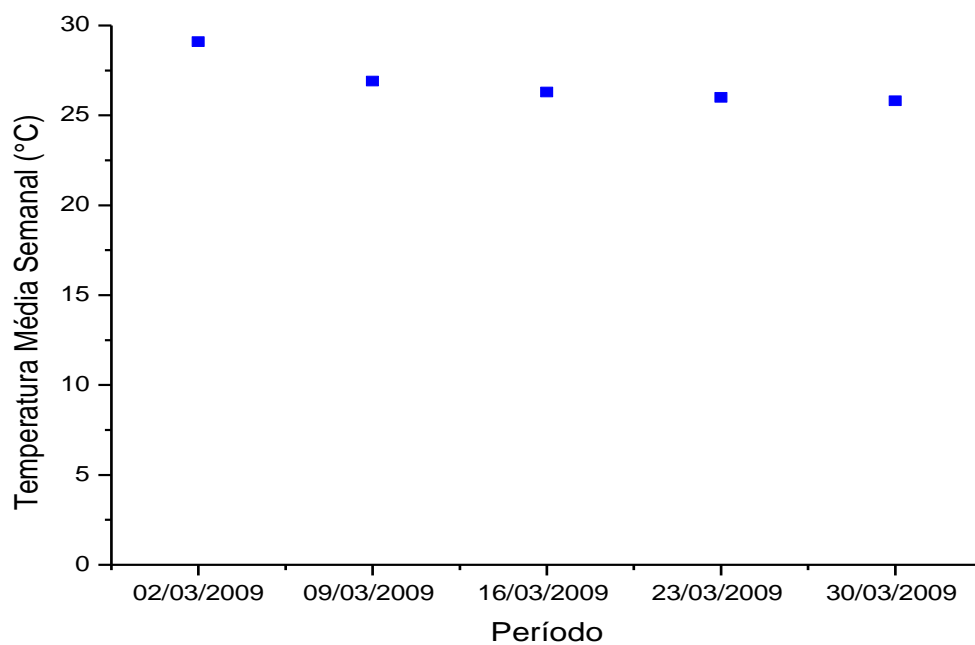


Figura 37. Temperatura média do mês de Março de 2009 (CENTRO INTEGRADO DE INFORMAÇÕES AGROMETEOROLÓGICAS, 2009).

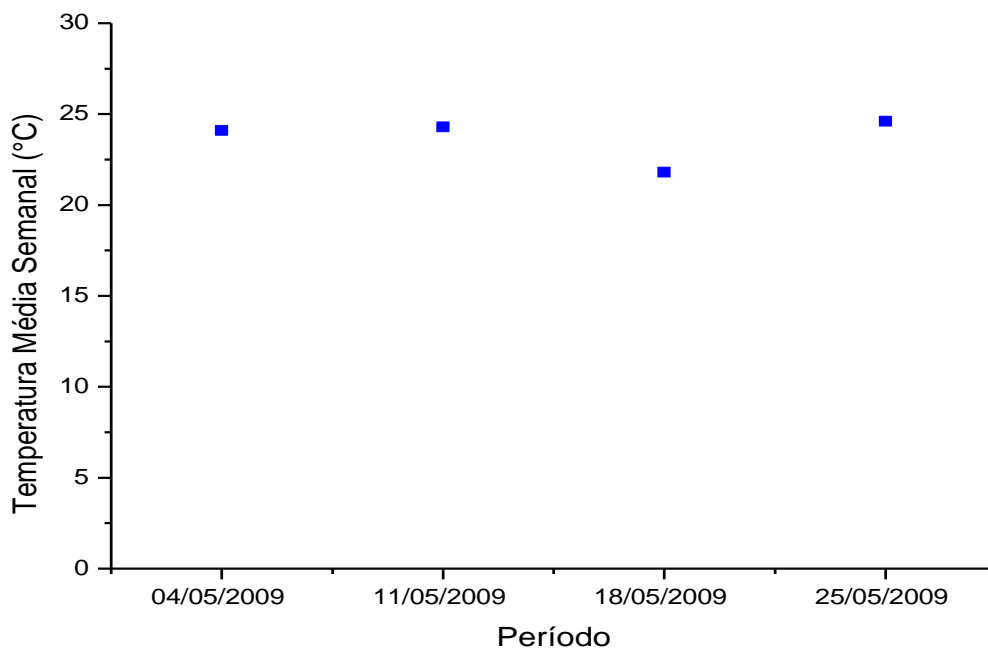


Figura 38. Temperatura média do mês de Maio de 2009 (CENTRO INTEGRADO DE INFORMAÇÕES AGROMETEOROLÓGICAS, 2009).

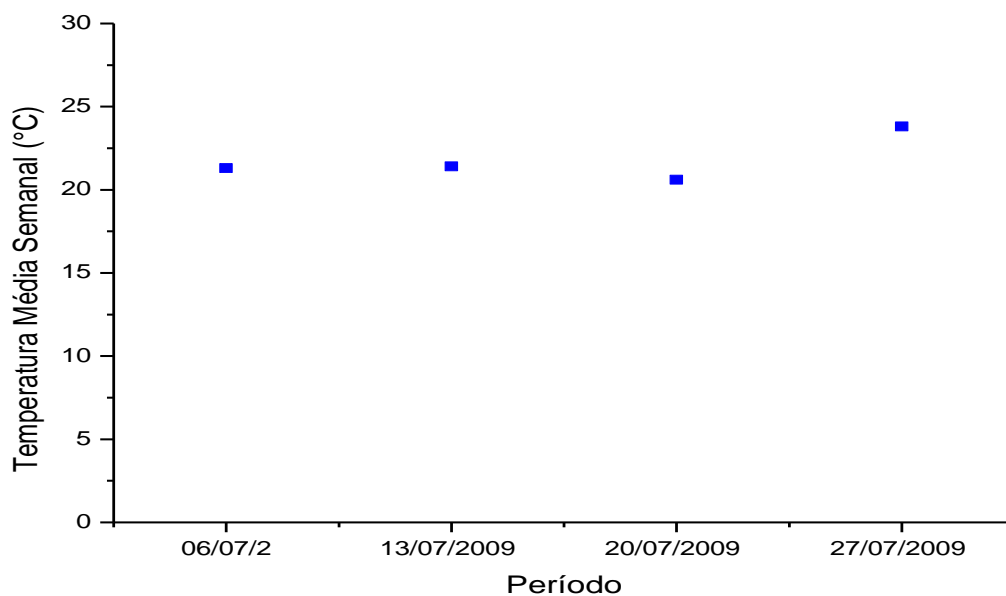


Figura 39. Temperatura média do mês de Julho de 2009 (CENTRO INTEGRADO DE INFORMAÇÕES AGROMETEOROLÓGICAS, 2009).

A Represa Municipal de São José do Rio Preto é classificada como de classe 2, segundo o Decreto 10.755/77 do estado de São Paulo, que dispõe sobre o enquadramento dos corpos de água receptores na classificação prevista no Decreto

nº 8.468/76 do estado de São Paulo. Este último e a Resolução CONAMA 357/05, estabelecem para esta classe um valor mínimo de $5,0\text{mgL}^{-1}$ para o oxigênio dissolvido (OD). Já para o pH a Resolução CONAMA 357/05 estabelece a faixa de 6,0 a 9,0 para corpos hídricos de classe 2.

Mediu-se com oxímetro a temperatura e o oxigênio dissolvido da água no momento da coleta e os resultados estão apresentados nas Tabelas 23 a 26. No laboratório foram feitas as análises de pH (Tabelas 23 a 26) e dos hormônios (Figura 40 a 42).

Tabela 23. Oxigênio dissolvido, temperatura e pH das amostras de água coletadas no mês de janeiro de 2009.

| Pontos | Oxigênio dissolvido (mgL^{-1}) | Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) | pH |
|---------|--|---------------------------------------|------|
| Ponto 1 | 5,79 | 28,7 | 7,73 |
| Ponto 2 | 5,84 | 28,5 | 7,82 |
| Ponto 3 | 5,80 | 28,3 | 7,80 |
| Ponto 4 | 5,83 | 28,1 | 7,68 |
| Ponto 5 | 5,95 | 27,6 | 7,67 |
| Ponto 6 | 6,64 | 27,3 | 7,69 |

Tabela 24. Oxigênio dissolvido, temperatura e pH das amostras de água coletadas no mês de março de 2009.

| Pontos | Oxigênio dissolvido (mgL^{-1}) | Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) | pH |
|---------|--|---------------------------------------|------|
| Ponto 1 | 6,8 | 28,4 | 7,15 |
| Ponto 2 | 2,5 | 28,4 | 6,94 |
| Ponto 3 | 5,4 | 28,3 | 7,19 |
| Ponto 4 | 7,7 | 27,1 | 6,94 |
| Ponto 5 | 4,8 | 26,8 | 7,03 |
| Ponto 6 | 4,1 | 26,0 | 6,92 |

Tabela 25. Oxigênio dissolvido, temperatura e pH das amostras de água coletas no mês de maio de 2009.

| Pontos | Oxigênio dissolvido (mgL ⁻¹) | Temperatura (°C) | pH |
|---------|---|---------------------|------|
| Ponto 1 | 7,4 | 31,3 | 7,47 |
| Ponto 2 | 5,8 | 29,1 | 6,73 |
| Ponto 3 | 6,9 | 24,8 | 7,50 |
| Ponto 4 | 7,1 | 24,2 | 7,49 |
| Ponto 5 | 6,8 | 24,7 | 7,56 |
| Ponto 6 | 7,5 | 24,3 | 7,51 |

Tabela 26. Oxigênio dissolvido, temperatura e pH das amostras de água coletadas no mês de julho de 2009.

| Pontos | Oxigênio dissolvido (mgL ⁻¹) | Temperatura (°C) | pH |
|---------|---|---------------------|------|
| Ponto 1 | 1,6 | 21,3 | 7,72 |
| Ponto 2 | 2,6 | 21,6 | 7,92 |
| Ponto 3 | 1,8 | 21,6 | 7,85 |
| Ponto 4 | 1,3 | 20,5 | 7,47 |
| Ponto 5 | 1,6 | 20,4 | 7,53 |
| Ponto 6 | 1,4 | 20,2 | 7,46 |

O pH da água da Represa Municipal de São José do Rio Preto (SP) em todos os pontos e meses de coleta ficou na faixa de 6,0 a 9,0 obedecendo a Resolução CONAMA 357/05 para corpos hídricos de classe 2. Já o oxigênio dissolvido (OD) ficou abaixo do estabelecido pelo Decreto nº 8.468/76 do estado de São Paulo e a Resolução CONAMA 357/05 para os meses de março (ponto 2, 5 e 6) e julho (todos os pontos), isto pode ter ocorrido devido a represa receber esgoto sanitário.

Não foi observada a presença dos hormônios do 17 α -etinilestradiol (Figura 40), do 17 β -estradiol (Figura 41) e do levonorgestrel (Figura 42) até o limite de detecção do método, nas análises das amostras de água coletada na Represa Municipal de São José do Rio Preto por HPLC/FLU/DAD. Outro autor, Kuster et al (2009) também não encontrou em seus estudos os hormônios 17 α -etinilestradiol, 17 β -etinilestradiol e levonorgestrel no Rio de Janeiro (RJ) até o limite de detecção do método (LD) para rios, sendo o LD de 7,55; 2,27 e 1,16ngL⁻¹, respectivamente.

Para cada coleta feita como recomendação da RE-899 de 2003 da ANVISA algumas amostras foram fortificadas para o controle de qualidade (CQ) nas

concentrações de 0,1; 0,3; 1,0; 10; 22,0 e 45,0 μgL^{-1} para o 17 α -etinilestradiol, 0,15; 0,45; 5,0; 19,0; 37,0 μgL^{-1} para o 17 β -estradiol e 0,15, 0,45, 10,0; 162,0; 324,0 μgL^{-1} para o levonorgestrel.

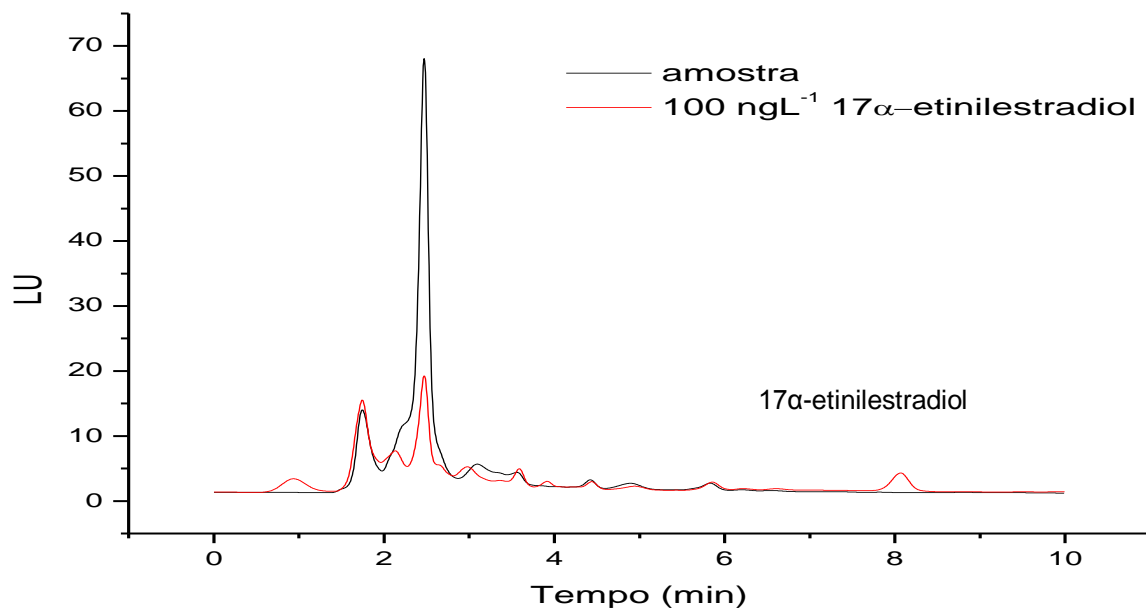


Figura 40. Amostra de água da coleta de março fortificada com 17 α -etinilestradiol.

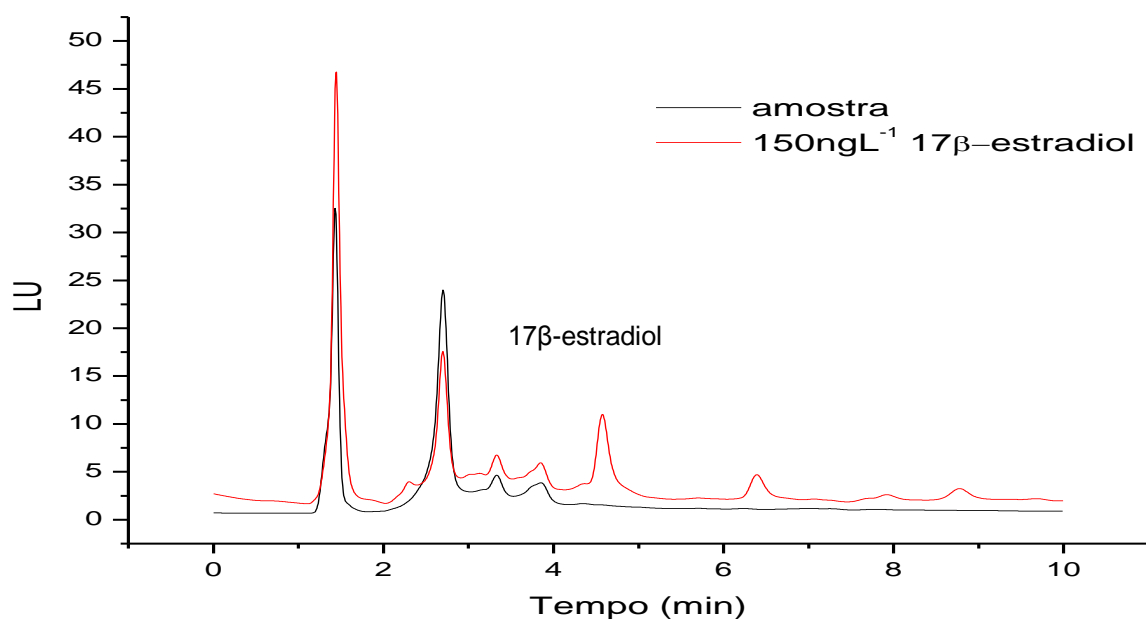


Figura 41. Amostra de água da coleta de março fortificada com 17 β -estradiol.

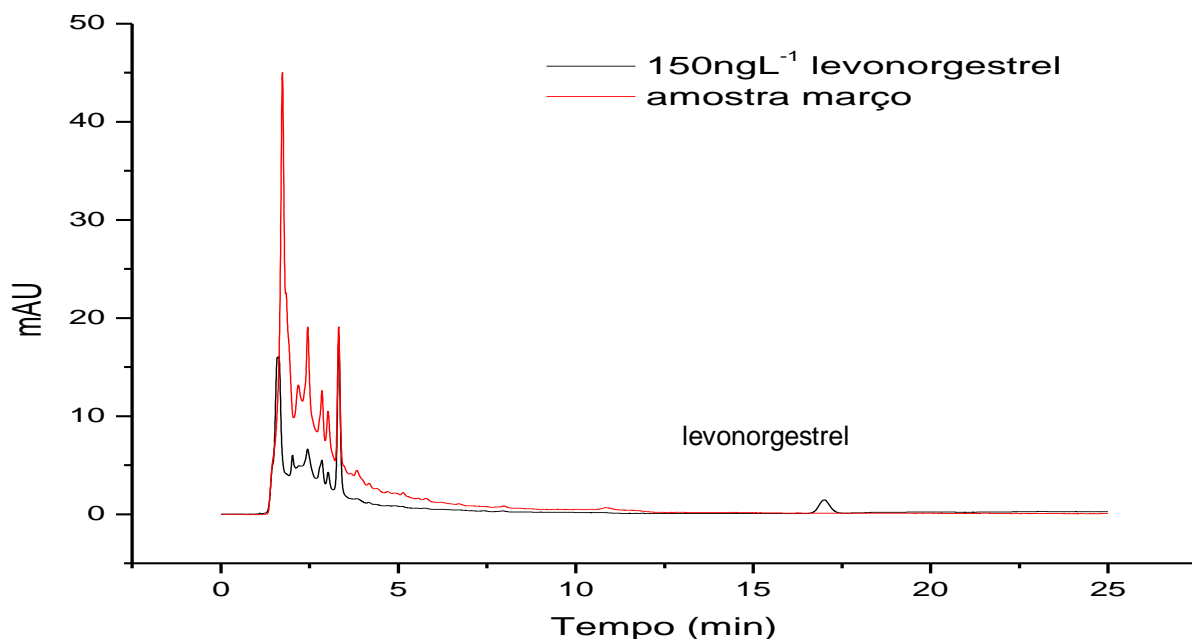


Figura 42. Amostra de água da coleta de março fortificada com levonorgestrel.

Como a Represa Municipal de São José do Rio Preto (SP) recebe esgoto sanitário decidiu-se por usar bioindicador de efeito endócrino. Para tanto utilizou-se análise de vitelogenina (VTG) por ELISA, com o intuito de verificar o efeito desse ambiente em peixes.

5.5. Análise de vitelogenina (VTG)

Para verificar o efeito endócrino da água da Represa Municipal de São José do Rio Preto (SP) fez-se o teste de ELISA para análise de VTG do plasma sanguíneo de peixes machos e de fêmeas capturados na referida represa. Primeiramente fez-se a análise linear das concentrações de VTG 0,24; 0,49; 0,98; 1,95; 3,91; 7,81 e 31,3ngmL⁻¹ que teve como resultado R² de 0,9949 (Figura 43).

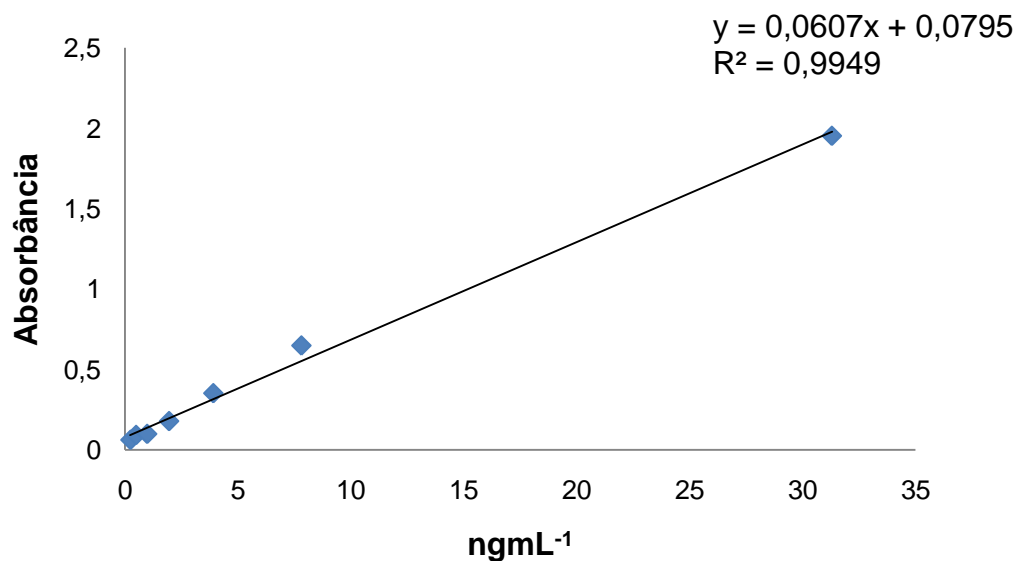


Figura 43. Linearidade das concentrações de VTG.

Os valores da absorbância das amostras de VTG do plasma sanguíneo de peixes com e sem diluição foram colocados na equação da reta, e assim, obteve-se as concentrações de VTG.

Os resultados das análises de VTG do plasma sanguíneo de peixes demonstram que as fêmeas (Figuras 45 e 47) apresentaram maiores concentrações de VTG que os machos (Figuras 44 e 46), sendo encontrados na ordem de μgmL^{-1} e ngmL^{-1} , respectivamente.

A análise de VTG dos peixes capturados no ponto 1 (Figura 44 e 45) demonstrou que os carás (*Geophagus brasiliensis*) fêmeas (Figura 45) apresentaram menores concentrações de VTG em relação às fêmeas das outras espécies estudadas. Os peixes fêmeas da espécie *Satanoperca papaterra* (zoiúdo) apresentaram concentração intermediária de VTG. Já os peixes fêmeas da espécie *Tilapia rendalli* (Tilápias rendali) apresentaram maior concentração de VTG. O mesmo comportamento em relação à concentração de VTG no plasma sanguíneo foi observado para os peixes machos capturados no ponto de coleta número 1 (Figura

44). Isto se deve ao fato da concentração de VTG variar de acordo com a espécie e fase do ciclo de vida (REIS, 2008).

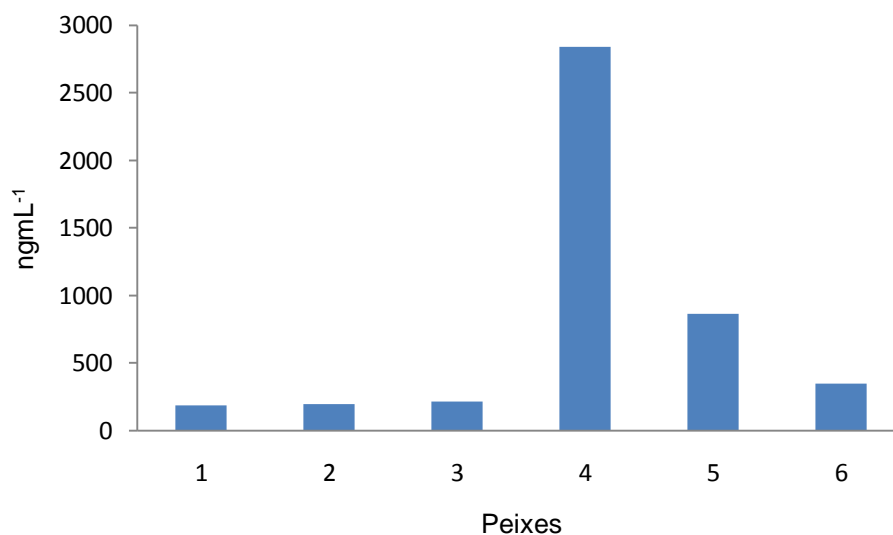


Figura 44. Concentração de VTG encontrada nas amostras de peixes machos capturados no ponto 1 (captação de água); Amostras de peixes da espécie Cará (*Geophagus brasiliensis*) representados pelos números 1, 2, e 3; Tilápia rendali (*Tilapia rendalli*) representados pelos números 4 e 5; Zoiúdo (*Satanoperca papaterra*) representados pelo número 6.

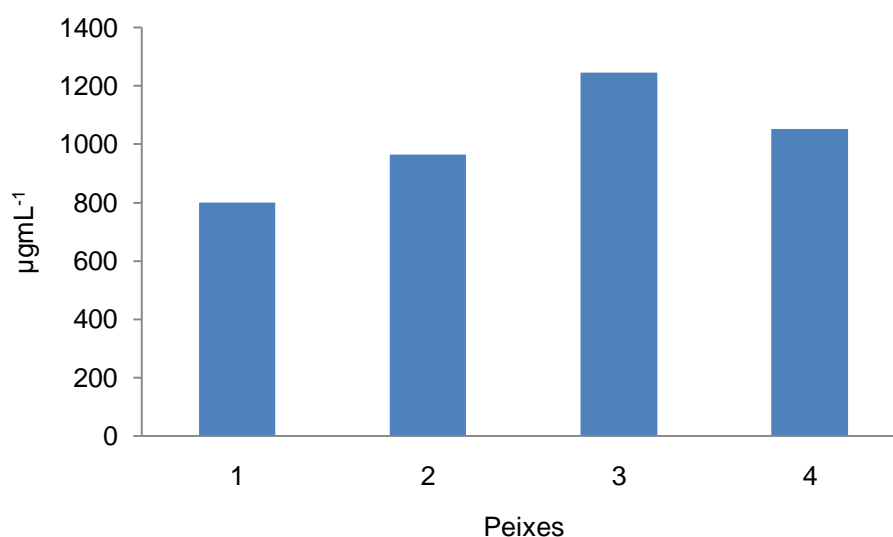


Figura 45. Concentração de VTG encontrada nas amostras de peixes fêmeas capturados no ponto 1 (captação de água); Amostra de peixes da espécie Cará (*Geophagus brasiliensis*) representado pelo número 1, Zoiúdo (*Satanoperca papaterra*) representado pelo número 2; Tilápia rendali (*Tilapia rendalli*) representados pelos números 3 e 4.

Observa-se pela Figura 46 que todas as amostras de plasma sanguíneo de peixes carás machos capturados no ponto 5 apresentaram concentrações de VTG na faixa de 152,39 a 181,22 ngmL⁻¹. Os carás fêmeas (Figura 47) apresentaram concentrações de VTG no plasma sanguíneo de peixes na faixa de 474,46 a 800,66 μgmL⁻¹.

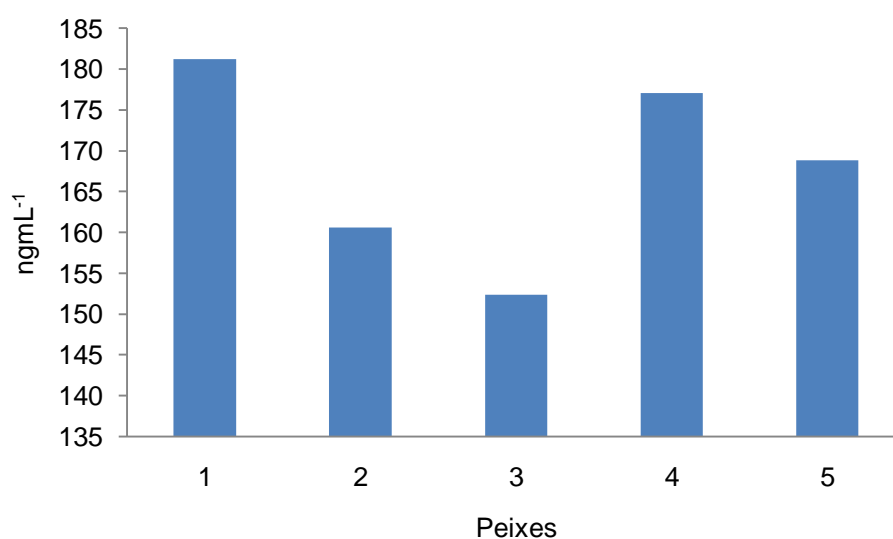


Figura 46. Concentração de VTG encontrada nas amostras de Carás (*Geophagus brasiliensis*) machos capturados no ponto 5 (lançamento de esgoto).

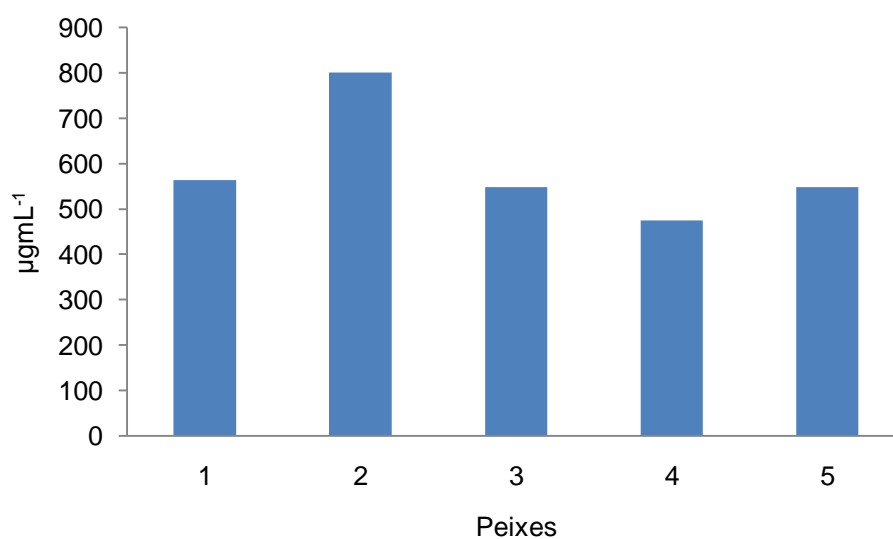


Figura 47. Concentração de VTG encontrada nas amostras de Carás (*Geophagus brasiliensis*) fêmeas capturados no ponto 5 (lançamento de esgoto).

Não houve diferença na faixa de concentração de VTG no plasma sanguíneo dos peixes machos (Figuras 44 e 46), quando se compara as concentrações de VTG nas amostras de plasma de sangue dos peixes da espécie *Geophagus brasiliensis* (Carás) capturados no ponto 1 (Figuras 44), local de captação de água para abastecimento da população, e dos capturados no ponto 5 (Figuras 46) local de lançamento de esgoto. O mesmo pode ser observado, quando se compara os carás fêmeas capturados no ponto 1 (Figura 45) e dos capturados no ponto 5 (Figura 47). Isto pode ter ocorrido, porque no ponto de coleta 5 há lançamento de esgoto diretamente e antes do ponto 1 há também lançamentos de esgoto, causando condições de igualdade quanto à presença de esgoto sanitário entre os dois pontos (1 e 5).

As amostras de plasma sanguíneo de peixes machos capturados na Represa Municipal de São José do Rio Preto (SP) apresentaram VTG na concentração na faixa de 152,4 a 2841,8ngmL⁻¹ e as fêmeas de 474,4 a 1245,4µgmL⁻¹. Estes valores são equivalentes aos encontrados por Thorpe et al (2009) para peixes expostos a efluentes com estrona e estradiol nas concentrações de 2,1±0,3 a 92,7±64,2ngL⁻¹ e de 0,5±0,2 a 4,4±0,5ngL⁻¹, respectivamente. Neste estudo os autores encontraram a concentração de VTG para os peixes machos em torno de 365 a 225.000ngmL⁻¹ e para as fêmeas de 270µgmL⁻¹.

As concentrações de VTG encontradas no plasma sanguíneo de peixes capturados na Represa Municipal de São José do Rio Preto (SP) indicam que há substância de efeito estrógeno na água, mas não se pode afirmar que sejam hormônios. Pode haver outras substâncias que podem contribuir para o aumento do potencial estrogênico da água da represa em estudo e, portanto, podem causar aumento do nível de VTG no plasma sanguíneo de peixes.

6. CONCLUSÃO

As análises por HPLC/DAD/FLU das amostras de água da Represa Municipal de São José do Rio Preto (SP) não indicaram até o limite de detecção a presença dos hormônios 17α -etinilestradiol, 17β -estradiol e levonorgestrel.

As análises de VTG por ELISA do plasma sanguíneo de peixes capturados na Represa Municipal de São José do Rio Preto (SP) demonstraram que há substâncias com efeito endócrino na água devido aos níveis de VTG encontrado nos peixes, mas não se pode afirmar que sejam os hormônios estudados.

7. BIBLIOGRAFIA

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução-RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 12 fev. 2008.

ALDA, M. J. L.; BARCELÓ, D. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 892, p. 391–406, 2000.

ALDA, M. J. L.; BARCELÓ, D. 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. **Journal of Chromatography A**, v. 911, p. 203–210, 2001.

ALDA, M. J. L.; DÍAZ-CRUZ, S.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 503–526, 2003.

ALMEIDA, C.; NOGUEIRA, J.M.F. Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1303–1311; 2006.

AMERICAN CHEMISTRY COUNCIL (ACC). **Chemicals in the environment and the endocrine system**. Disponível em: <http://www.americanchemistry.com/s_phthalate/sec.asp?CID=2014&DID=8697>. Acesso em: 12 abr. 2009.

ARAÚJO, J. C. **Estudo da eficiência do tratamento de efluentes domésticos da cidade de Araraquara-SP na remoção de hormônios sexuais**. 2006. 83 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

ARUKWE, A.; GOKSØYR, A. Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comparative Hepatology* 2:4, 2003. Disponível em: <<http://www.comparative-hepatology.com/content/2/1/4>>. Acesso em: 29 set. 2009.

BAREL-COHEN, K.; SHORE, L.S.; SHEMESH, M.; WENZEL, A.; MUELLER, J.; KRONFELD-SCHOR, N. Monitoring of natural and synthetic hormones in a polluted river. **Journal of Environmental Management**, v. 78, n. 1, p. 16-23, 2006.

BARONTI, C.; CURINI, R.; D'ASCENZO, G.; DICORCI, A. , GENTILI, A.; SAMPERI, R. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. **Environmental Science & Technology**, v. 34, n. 24, p. 5059-5066, 2000.

BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 172-175, 2001.

BENFEY, T. J.; DONALDSON, E. M.; OWEN, T.G. An homologous radioimmunoassay for coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) vitellogenin, with general applicability to other Pacific salmonids. **General and Comparative Endocrinology**, v. 75, p. 78–82, 1989.

BILA, D.M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Química Nova**, v. 33, p. 651–666, 2007.

BIRKETT, J. W. Scope of the problem. In: BIRKETT, J. W.; LESTER, J.N. (Eds.). **Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment process**. Boca Raton: CRC 2003. p. 9-43.

BOWLER, R. M.; CONE, J. E. **Segredos em medicina do trabalho**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001. p. 396.

BRASIL. Secretária do Estado do meio ambiente. CETESB. **Relatório**. 2008. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/publicacoes.asp>>. Acesso em: 28 ag. 2009.

BRASIL. Secretaria do Estado do meio ambiente. CETESB. 2009. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em: 2 ago. 2009.

CAMPBELL, C. G.; BORGLIN, S. E.; GREEN, F. B.; GRAYSON, A.; WOZEI, E.; STRINGFELLOW, W. T. Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: a review. **Chemosphere**, v. 65, p. 1265–1280, 2006.

CARGOUËT, M.; PERDIZ, D.; LEVI, Y. Evaluation of the estrogenic potential of river and treated waters in the Paris area (France) using in vivo and in vitro assays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, p. 149–156, 2007.

CHEN, C.; WEN, T.; WANG, G., CHENG, H.; LIN, Y.; LIEN, G. Determining estrogenic steroids in Taipei waters and removal in drinking water treatment using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Science of the Total Environment**, v. 378, p. 352–365, 2007.

CENTRO INTEGRADO DE INFORMAÇÕES AGROMETEOROLÓGICAS (CIIAGRO). **Balanço Hídrico por local**. Disponível em: <<http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline/MenuBH.htm>>. Acesso em: 15 set. 2009.

COLBORN, T.; VOM SAAL, F.S.; SOTO, A.M. Developmental effects of endocrine disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environmental Health Perspectives**, v. 101, p. 378–83, 1993.

COLBORN, T.; DUMANOSKI, D.; MYERS, J.P. **O futuro roubado**. Porto Alegre: L&PM Editores, 2000. p. 354.

D'ASCENZO, G.; DI CORCIA, A.; GENTILI, A.; MANCINI, R.; MASTROPASQUA, R.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. **Science of the Total Environment**, v. 302, p. 199–209, 2003.

DEBORDE, M.; RABOUAN, S.; GALLARD, H.; LEGUBE, B. Aqueous chlorination Kinetics of some endocrine disruptors. **Environmental Science Technology**, v. 38, p. 5577-5583, 2004.

DESBROW, C.; ROUTLEDGE, E.J.; BRIGHTY, G.C.; SUMPTER, J.P.; WALDOCK, M. Identification of estrogenic chemicals in STWeffluent. 1. chemical fractionation and in vitro biological screening. **Environmental Science & Technology**, v. 32, p. 1549–1558, 1998.

ESPLUGAS, S.; BILA, D. M.; KRAUSE, L. G. T.; DEZOTTI, M. Ozonation and advanced oxidation Technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products(PPCPs) in water effluents. **Journal of Hazardous Materials**, v. 149, p. 631–642, 2007.

FENG, X.; TU, J.; DING, S.; WU, FENG; DENG, N. Photodegradation of 17 β -estradiol in water by UV–vis/Fe(III)/H₂O₂ system. **Journal of Hazardous Materials B**, v. 127, p. 129–133, 2005.

FENSKE, M.; AERLE, R.; BRACK, S.; TYLER, C. R.; SEGNER, H. Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 129, p. 217-232, 2001.

FERNANDEZ, M. P.; BUCHANAN, I. D.; IKONOMOU, M. G. Seasonal variability of the reduction in estrogenic activity at a municipal WWTP. **Water Research**, v. 42, p. 3075-3081, 2008.

FOLHA online. Disponível em:

<<http://www1.folha.uol.com.br/folha/cotidiano/ult95u126854.shtml>>. Acesso em: 28 out. 2009.

FOLMAR, L.C.;HEMMER, M.; HERMMER, R.;BOWMAN,C.; DENSLOW, N.D. Comparative estrogenicity of estradiol, ethynyl estradiol, and diethylestirestrol in an in vivo male sheepshead minnow (*Cyprinodon variegates*), vitellogenin bioassay. **Aquatic Toxicology**, v. 49, p. 77-88, 2000.

GHISELLI, G. **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)**. 2006. 190 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

GOOGLE EARTH. Disponível em: <<http://www.google.com.br/intl/pt-BR/options/>>. Acesso em: 5 jan. 2009.

GRAY, M.A.; METCALFE, C.D. Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, p. 1082–1086, 1997.

GUERRA, M. O.; OLIVEIRA, L. E.; LAGE, L. V.; SOUZA, E. R.; PETERS, V. M. Levonorgestrel administration during rat lactation: offspring development. **Ciência e Cultura**, v. 51, p. 50-54, 1999.

GUZMÁN, J. M.; NORBERG, B.; RAMOS, J.; MYLONAS, C. C.; MAÑANÓS, E. L. Vitellogenin, steroid plasma levels and spawning performance of cultured female Senegalese sole (*Solea senegalensis*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 156, p. 285–297, 2008.

HARRIS, J. E.; SHEAHAN, D. A.; JOBLING, S.; MATTHIESSEN, P.; NEALL, P.; ROUTLEDGE, E. J.; RYCROFT, R.; SUMPTER, J. P.; TYLOR, T. A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, n. 11, p. 1993 – 2002, 1996.

HARRIS, J. E.; SHEAHAN, D. A.; JOBLING, S.; MATTHIESSEN, P.; NEALL, P., SUMPTER, J. P.; TYLOR, T.; ZANAM, N. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenises in caged male trout. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 534 – 342, 1997.

HU, J.Y.; CHENG, S. J.; AIZAWA, T.; TERAQ, Y.; KUNIKANE, S. Products of Aqueous chlorination of 17 β -estradiol and their estrogenic activities. **Environmental Science Technology**, v. 37, p. 5665–5670, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em: <<http://www.ibge.com.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso em: 14 set. 2009.

IRMAK, S.; ERBATUR, O.; AKGERMAN, A. Degradation of 17 β -estradiol and bisphenol A in aqueous medium by using ozone and ozone/UV techniques. **Journal of Hazardous Materials B**, v. 126, p. 54–62, 2005.

JANOSECK, J.; HILSCHEROVÁ, K.; BLÁHA, L.; HOLOUBEK, I. Environmental xenobiotics and nuclear receptors-Interactions, effects and in vitro assessment. **Toxicology in Vitro**, v. 20, p. 18–37, 2006.

JOBLING, S.; SUMPTER, J.P. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an in-vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. **Aquatic Toxicology**, v. 27, p. 361–372, 1993.

JOBLING, S.; NOLAN, M.; TYLER, C. R.; BRIGHTY, G.; SUMPTER, J. P. Widespread sexual disruption in wild fish. **Environmental Science & Technology**, v. 32, p. 2498 –2506, 1998.

JOHNSON, A.C.; SUMPTER, J.P. Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 24, p. 4697-4703, 2001.

JOHNSON, A. C.; BELFROID, A.; DI CORCIA, A. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. **The Science of Total Environment**, v. 87, p. 163-173, 2000.

KING, S. C.; HASSELL, K.; NUGEGODA, D.; KRISTIANSEN, S. I. The assessment of vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in two Australian perciformes. **Marine Environmental Research**, v. 66, p. 116–118, 2008.

KOLPIN, D. W.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; THURMAN, E. M.; ZAUGG, S. D.; BARBER, L. B.; BUXTON, H. T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S Streams, 1999 – 2000: A National Reconnaissance. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 6, p. 1202 – 1211, 2002.

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

LAI, K.M.; JOHNSON, K.L.; SCRIMSHAW, M.D.; LESTER, J.N. Binding of Waterborne Steroid Estrogens to Solid Phases in River and Estuarine Systems. **Environmental Science & Technology**, v. 34, p. 3890-3894, 2000.

LEE, H.B.; PEART, T.E. Determination of 17 beta-estradiol and its metabolites in sewage effluent by solid-phase extraction and gas chromatography mass spectrometry. **The Journal of AOAC International**, v. 81, p. 1209–1216, 1998.

LEE, L.S.; STROCK, T.J.; SARMAH, A.K.; SURESH, P.; RAO, C. Sorption and dissipations of testosterone, estrogens and their primary transformation products in soil and sediment. **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 18, p. 4098-4105, 2003.

LEWIS, R.J. **Carcinogenically active chemicals**. New York. Van Nostrand Reinhold, 1991. p. 1153.

LIU, Z.; KANJO, Y.; MIZUTANI, S. Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in waste water treatment — physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: A review. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 731 – 748, 2009.

LOPES, L.G. **Estudo sobre ocorrência de estrógenos em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal – SP**. 2007. 121 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

MANIERO, M.G.; BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Degradation and estrogenic activity removal of 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol by ozonation and O₃/H₂O₂. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 105 – 115, 2008.

MATSUMOTO, K.; TSUKAHARA, Y.; UEMURA, T.; TSUNODA, K.; KUME, H.; KAWASAKI, S.; TADANO, J.; MATSUYA, T. Highly sensitive time-resolved fluorometric determination of estrogens by high-performance liquid chromatography using a β -diketonate europium chelate. **Journal of Chromatography B**, v. 773, p. 135–142, 2002.

MEYER, A.; SARCINELLI, P. N.; MOREIRA, J. C. Estarão alguns grupos populacionais brasileiros sujeitos à ação de disruptores endócrinos?. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 15, p. 845-850, 1999.

MILLS, LJ; CHICHESTER, C. Review of evidence: are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations?. **Science of Total Environment**, v. 43, p. 1-34, 2005.

MORTENSEN, A. S.; ARUKWE, A. Effects of 17 α -ethinylestradiol on hormonal responses and xenobiotic biotransformation system of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquatic Toxicology**, v. 85, p. 113–123, 2007.

MOURA, J. A. **Estudo da Eficiência de Estações de Tratamento de Esgoto –ETE e Estações de Tratamento de Água –ETA na Eliminação de Resíduos de Estrógenos Naturais e Sintéticos na UGRHI-13 (Tietê-Jacaré)**. 2009. 188 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

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

NOGUEIRA, J. M. F. Desreguladores endócrinos: efeitos adversos e estratégias para monitorização dos sistemas aquáticos. **Química**, v. 88, p. 65-71, 2003.

OLEA, N.; FERNÁNDEZ, M.F.; AREQUE, P.; OLEA, S. F. Disruptores endócrinos: una historia muy personal y con múltiples personalidades. **Gaceta Sanitaria**, v. 16, n. 3, p. 209-211, 2002.

PALMLUND, I.; APFEL, R.; BUITENDIJK, S.; CABAV, A.; FORSIBERG, J. Effects of dethylestilbestrol (DES) medication during pregnancy: report from a symposium at the 10th International Congress of ISPOG. **Journal of Psychosomatic Obstetrics & Gynecology**, v. 14, p. 71 – 89, 1993.

PAUWELS, B.; DECONINCK, S.; VERSTRAETE, W. Electrolytic removal of 17 α -ethinylestradiol (EE2) in water streams. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 81, p. 1338–1343, 2006.

PETROVIC, M.; ELJARRAT, E.; ALDA, M. J. L.; BARCELO´, D. Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples. Review. **Journal of Chromatography A**, v. 974, p. 23–51, 2002.

PEDROUZO, M.; BORRULL, F.; POCURULL, E.; MARCÉ, R. M. Estrogens and their conjugates: Determination in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Talanta**, 2009. In Press.

PEÑALVER, A.; POCURULL, E.; BORRULL, F.; MARCÉ, R.M. Method based on solid-phase microextraction–high-performance liquid chromatography with UV and electrochemical detection to determine estrogenic compounds in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 964, p. 153–160, 2002.

PURDOM, C.; HARDIMAN, P.; BYE, V.; ENO, N.; TYLER C.; SUMPTER, J.; ROUTLEDGE, E. J. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. **Chemistry and Ecology**, v. 8, p. 275 – 285, 1994.

RAIMUNDO, C. C. M. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia**. 2007. 108 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

RAVEN, P.H.; JOHNSON, G.B. **Biology**. 5 ed. Boston: WCB/McGraw-Hill, 1999. p. 1255.

REIS FILHO, R. W. **Hormônios estrógenos no Rio do Monjolinho, São Carlos – SP: Uma Avaliação da Problemática dos Desreguladores Endócrinos Ambientais**. 2008. 150 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

RODGER-GRAY, T. P.; JOBLING, S.; MORRIS, S.; MORRIS, S.; BRIGHTY, G.; WALDOCK, M. J.; SUMPTER, J. P.; TYLER, H. R. Long-Term Temporal Changes in the Estrogenic Composition of Treated Sewage Effluent and Its Biological Effects on Fish. **Environmental Science & Technology**, v. 34, p. 1521-1528, 2000.

ROBINSON, B. J.; HELLOU, J. Biodegradation of endocrine disrupting compounds in harbor seawater and sediments. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 5713–5718, 2009.

ROSENFELDT, E. J.; LINDEN, K.G. Degradation of endocrine disrupting chemical bisphenol A, ethinyl estradiol and estradiol during UV photolysis and advanced oxidation processes. **Environmental Science & Technology**, v. 38, p. 5476 – 5483, 2004.

ROUTLEDGE, E.J.; SHEAHAN, D.; DESBROW, C.; BRIGHTY, G.C.; WALDOCK, M.; SUMPTER, J.P. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. in vivo responses in trout and roach. **Environmental Science & Technology**, v. 32, p. 1559-1565, 1998.

SCHMID, T.; GONZALEZ-VALERO, J.; RUFLI, H.; DIETRICH, D. R. Determination of vitellogenin kinetics in male fathead minnows (*Pimephales promelas*). **Toxicology Letters**, v. 131, p. 65-74, 2002.

SHAW, I.; McCULLY, S. A review of the potential impact of dietary endocrine disrupters on the consumer. **Internacional Journal of Food Science and Technonology**, v. 37, p. 471-476, 2002.

SNYDER, S.A.; KEITH, T.L.; VERBRUGGE, D.A.; SNYDER, E.M.; GROSS, T.S.; KANNAN, K.; GIESY, J.P. Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures. **Environmental Science & Technology**, v. 33, p. 2814–2820, 1999.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Química orgânica**. 7 ed. Rio de Janeiro: LCT, 2000. v. 2, p. 474.

SOUZA, E.R.; OLIVEIRA, L.E.G.; GUERRA, M.O.; PETERS, V.M. Administração de levonorgestrel a ratas lactando: desenvolvimento físico das crias. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 19, p. 41-54, 2000.

SOUZA, J. B. G. **Estudo da ocorrência de tetraciclinas e estrógenos em água superficial, subterrânea e esgoto tratado na cidade de Campo Grande (MS)**. 2008. 155 f. Tese (Doutorado em Química) -Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

SPIRO, T. S.; STIGLIANI, W. N. Chemistry of the Environment. Prentice Hall. 356 p. STUMPE, B.; MARSCHNER, B. Factors controlling the biodegradation of 17 β -estradiol, estrone and 17 α -ethinylestradiol in different natural soils. **Chemosphere**, v. 74, p. 556–562, 2009.

SUMPTER, JP. Endocrine disrupters in the aquatic environment: an overview. **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica**, v. 33, p. 9-16, 2005.

TAKAI, Y.; TSUTSUMI, O. Synthetic estrogen as an endocrine disruptor-diethylstilbestrol and oral contraceptives. **Nippon Rinsho**, v. 58, n.12, p. 2404 – 2416, 2000.

TERNES, T. A.; KRECKEL, P.; MUELLER, J. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants –II. Aerobic batch experiments with activated sludge. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 91-99, 1999.

THORPE, K. L.; MAACK, G.; BENSTEAD, R.; TYLER, C. R. Estrogenic wastewater treatment works effluents reduce egg production in fish. **Environmental Science & Technology**, v. 43, p. 2976–2982, 2009.

TYLER, C.R.; JOBLING, S.; SUMPTER, J.P. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. Critical Reviews. **Toxicology**, v. 28, p. 319–361, 1998.

TYLER, C.R.; VAN AERLE, R.; HUTCHINSON, T.H.; MADDIX, S.; TRIP, H. An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, p. 337–347, 1999.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Special report on environmental endocrine disruption**: an effects assessment and analysis. Washington, DC: Office of Research and Development, 1997. EPA/630/R-96/012.

URBATZKA, R.; BOTTERO, S.; MANDICH, A.; LUTZ, I.; KLOAS, W. Endocrine disruptors with (anti)estrogenic and (anti)androgenic modes of action affecting reproductive biology of *Xenopus laevis*: I. Effects on sex steroid levels and biomarker expression. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 144, p. 310-318, 2007.

VIGANÒ, L.; BENFENATI, E.; CAUWENBERGE, A.; EIDEM, J. K.; ERRATICO, C.; GOKSØYR, A.; KLOAS, W.; MAGGIONI, S.; MANDICH, A.; URBATZKA, R. Estrogenicity profile and estrogenic compounds determined in river sediments by chemical analysis, ELISA and yeast assays. **Chemosphere**, v. 73, p. 1078–1089, 2008.

YING, G.; KOOKANA, R. S.; RU, Y. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. **Environmental International**, v. 28, p. 545–551, 2002.

YOONA, Y.; WESTERHOFFA, P.; SNYDERB, S. A.; ESPARZAA, M. HPLC-fluorescence detection and adsorption of bisphenol A, 17 β -estradiol, and 17 α -ethynyl estradiol on powdered activated carbon. **Water Research**, v. 37, p. 3530–3537, 2003.

ZHANGA, Y.; ZHOU, J.L.; NING, B. Photodegradation of estrone and 17 β -estradiol in water. **Water Research**, v. 41, p. 19–26, 2007.

ZERULLA, M.; LÄNGE, R.; STEGER-HARTMANN, T.; PANTER, G.; HUTCHINSON, T.; DIETRICH, D. R. Morphological sex reversal upon short-term exposure to Endocrine modulators in juvenile fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Toxicology Letters**, v. 131, p. 51-63, 2002.

WESTERHOFF, P.; YOON, Y.; SHYDER, S.; WERT, E. Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes. **Environmental Science & Technology**, v. 39, p. 6649-6643, 2005.

WINGARD, D.; TURIEL, J. Long-term effects of exposure to diethylstilbestrol.
Journal of Western Medicine, v. 149, p. 551 – 554, 1998.