



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro de Tecnologia e Ciências

Faculdade de Engenharia

Mariana Tavares de Luna

**Análise e ocorrência de Bisfenol A e atividade estrogênica em águas  
superficiais do Rio de Janeiro**

Rio de Janeiro

2016

Mariana Tavares de Luna

**Análise e ocorrência de Bisfenol A e atividade estrogênica em águas superficiais  
do Rio de Janeiro**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).  
Área de concentração: Saneamento Ambiental – Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Prof.<sup>ª</sup> Dr. Daniele Maia Bila (Orientadora)

Prof. Dr. Aleksandro Araújo da Silva (Coorientador)

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/B

L961 Luna, Mariana Tavares de.

Análise e ocorrência de Bisfenol A e atividade estrogênica em águas superficiais do Rio de Janeiro / Mariana Tavares de Luna. – 2016.

94f.

Orientador: Daniele Maia Bila.

Coorientador: Alexsandro Araujo da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia.

1. Engenharia Ambiental 2. Águas superficiais - Dissertações. 3. Desreguladores endócrinos - Dissertações. 4. Poluição - Rio de Janeiro (estado) - Dissertações. 5. Efluentes - Dissertações. I. Bila, Daniele Maia. II. Silva, Alexsandro Araujo da. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. IV. Título.

CDU 62:502.3

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação.

---

Assinatura

---

Data

Mariana Tavares de Luna

**Análise e ocorrência de Bisfenol A e atividade estrogênica em águas superficiais  
do Rio de Janeiro**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).  
Área de concentração: Saneamento Ambiental – Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Aprovada em 13 de abril de 2016.

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Daniele Maia Bila (Orientadora)  
Faculdade de Engenharia – UERJ

---

Prof. Dr. Alexsandro Araujo da Silva (Coorientador)  
Instituto de Química/DQO – UERJ

---

Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Riehl  
Instituto de Química/DQA – UFRJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Fabiana Valéria da Fonseca  
Escola de Química/DPI – UFRJ

Rio de Janeiro

2016

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha querida mãe.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe, que sempre me apoiou em todas as decisões que tomei, fossem quais fossem, inclusive a de fazer o mestrado.

Agradeço aos meus orientadores, por todo o conhecimento transmitido, a prof.<sup>a</sup> Daniele Bila pelo carinho, atenção e disponibilidade em todos os momentos e ao Prof. Alessandro Araújo por todo aprendizado na área da cromatografia.

À Flávia Licurgo, pela parceria na execução do trabalho, pela companhia nos laboratórios e nas coletas e por toda ajuda e experiência que me transmitiu.

À Giselle Gomes, por toda a paciência e dedicação ao ensinar a fazer o ensaio YES.

A ajuda do Sidnei, da Louise e de todos os outros alunos de Iniciação Científica com as análises físico-químicas.

Aos colegas, Fernanda Mury e Mari Barcellos, com quem passei grande parte dos meus dias e muitas vezes noites também, nas intermináveis horas de trabalho no LES.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento da minha dissertação.

## RESUMO

LUNA, Mariana Tavares de. *Análise e ocorrência de Bisfenol A e atividade estrogênica em águas superficiais do Rio de Janeiro*. 2016. 94f. Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia Ambiental) - Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Atualmente, determinadas atividades antrópicas como a indústria são responsáveis por alterar a qualidade dos recursos hídricos, por meio da eliminação de substâncias químicas que vêm sendo introduzidas no meio ambiente há algumas décadas, expondo os seres humanos e animais ao contato e a possíveis efeitos. Um grupo específico de substâncias, os chamados desreguladores endócrinos (DEs), são capazes de causar desequilíbrios no sistema endócrino de humanos e animais e, com isso, afetar a saúde, o crescimento e a reprodução, mesmo em concentrações relativamente baixas, na ordem de  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e  $\text{ng.L}^{-1}$ . Como não são removidos completamente dos efluentes por processos de tratamentos convencionais, podem estar presentes em matrizes aquáticas como as águas superficiais. O bisfenol A (BPA) é considerado um desregulador endócrino que apresenta atividade estrogênica, ou seja, capacidade em mimetizar o  $17\beta$ -estradiol, hormônio estrogênico natural do organismo e dessa forma causar desequilíbrio no sistema endócrino. O ensaio *in vitro* YES tem se mostrado uma ferramenta adequada para avaliar a atividade estrogênica de amostras complexas e as técnicas cromatográficas são usadas para detectar e quantificar a presença de BPA em matrizes aquáticas. Neste trabalho foi avaliada a ocorrência do Bisfenol A (BPA) e a atividade estrogênica em dois pontos de amostragem de água bruta do rio Guandu, Rio de Janeiro, e água potável. O BPA foi detectado por cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas (CGAR-EM) em água bruta, na faixa de 219,8 a 1766,9  $\text{ng.L}^{-1}$  no ponto 1, de 364,2 a 852,7  $\text{ng.L}^{-1}$  no ponto 2, e na faixa de 49,7 a 273,1  $\text{ng.L}^{-1}$  na água potável. A atividade estrogênica avaliada pelo ensaio *in vitro* YES para água bruta nos dois pontos amostrados, apresentou valores de EQ-E<sub>2</sub> de 1,2 a 8  $\text{ng.L}^{-1}$  no ponto 1, e de 1 a 32  $\text{ng.L}^{-1}$  no ponto 2, enquanto que a água potável não apresentou atividade estrogênica. A presente dissertação é uma contribuição para o aumento de informações acerca do BPA em águas superficiais destinadas ao abastecimento público de uma cidade populosa como o Rio de Janeiro.

Palavras-chave: Bisfenol A; Atividade estrogênica; Cromatografia gasosa; Águas superficiais; Ensaio *in vitro* YES; Desreguladores Endócrinos.

## ABSTRACT

LUNA, Mariana Tavares de. *Analysis and occurrence of Bisphenol A and estrogenic activity in surface waters of Rio de Janeiro*. 2016. 94f. Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia Ambiental) - Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Certain human activities, such as industry are responsible for affect the quality of water resources, through the elimination of chemicals that have been introduced in the environment for decades, exposing humans and animals to contact and possible effects. A specific group of substances called endocrine disruptors (EDs), are capable of causing negative effects in the endocrine system of humans and animals and, therefore, health affect the growth and reproduction, even at relatively low concentrations, in the order of  $\mu\text{g.L}^{-1}$  and  $\text{ng.L}^{-1}$ . Because they are not removed completely by conventional effluent treatment processes, they can be present in water matrices, such as surface water. Bisphenol A (BPA), is considered an endocrine disrupter that has estrogenic activity, ie ability to mimic  $17\beta$ -estradiol, natural estrogen hormone in the body and thereby cause disruption in the endocrine system. The in vitro assay YES has proven a good tool to evaluate the estrogenic activity of complex samples and chromatographic analytical techniques are being used to detect and quantify the presence of BPA in water matrices. In this work it was evaluated the occurrence of Bisphenol A (BPA) and the estrogenic activity in raw water sampling Guandu River, Rio de Janeiro, Brasil, and drinking water. BPA was detected by gas chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (GC-MS) in raw water, in the range from 219,8 to 1766.9  $\text{ng.L}^{-1}$  in sampling site 1, 364,2 to 852,7 in sampling site 2, and in the range from 49.7 to 273.1  $\text{ng.L}^{-1}$  in drinking water. The estrogenic activity assessed by in vitro assay YES to raw water in the two sampling sites presented EQ-E<sub>2</sub> values from 1.2 to 8  $\text{ng.L}^{-1}$  in site 1 and 1 to 32  $\text{ng.L}^{-1}$  in site 2, while the drinking water showed no estrogenic activity. This work is a contribution to the increase of information about BPA in surface water for public supply of a crowded city like Rio de Janeiro.

Keywords: Bisphenol A; estrogenic activity; Gas chromatography; Surface water; Yeast Estrogen Screen (YES); Endocrine Disrupters.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Processo de desregulação endócrina.....	18
Figura 2 - Estrutura química de alguns compostos estrogênicos, incluindo o natural 17- $\beta$ estradiol. ...	21
Figura 3 - Esquema do sistema de expressão de atividade estrogênica pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante (ensaio YES).....	32
Figura 4 - Etapas da EFS.....	34
Figura 5 - Bacia hidrográfica do rio Guandu .....	39
Figura 6 - Ponto 1 de amostragem de água bruta do rio Guandu em Japeri.....	40
Figura 7 - Ponto 2 de amostragem de água bruta do rio Guandu em Nova Iguaçu.....	40
Figura 8 - Sistema de filtração à vácuo à esquerda e membranas usadas no processo de filtração à direita.....	44
Figura 9 - Fotos dos aparatos da extração em fase sólida .....	45
Figura 10 - Fluxograma resumido das etapas de filtração e EFS que antecedem as análises cromatográficas e do ensaio YES.....	46
Figura 11 - Demonstração de etapas da execução do ensaio in vitro YES nas placas de diluição e de análise.....	50
Figura 12 - Placa de reação do ensaio in vitro YES no início do período de incubação das 72h.....	51
Figura 13 - Foto da placa de 96 poços ao final das 72h no ensaio in vitro YES.....	58
Figura 14 - Curva dose-resposta do controle positivo 17 $\beta$ -estradiol na faixa de concentração de 2724 a 1,3301 ng.L <sup>-1</sup> obtida em um dos ensaios in vitro YES realizados ao longo do estudo .....	59
Figura 15 - Curva dose-resposta do composto BPA no ensaio YES na faixa de concentração de 24750 $\mu$ g.L <sup>-1</sup> a 12,08 $\mu$ g.L <sup>-1</sup> .....	60
Figura 16 - Valores de EQ-E2 das amostras de água bruta do rio Guandu coletadas no período de março a dezembro de 2015.....	61
Figura 17 - Cromatograma de monitoramento de íons seletivos para o BPA (m/z 213) .....	65
Figura 18 - Cromatograma do BPA mostrando o seu tempo de retenção e os íons monitorados .....	65
Figura 19 - Curva analítica do CGAR- EM – MSI do BPA nas concentrações de 2,29 - 73,70 $\mu$ g.L <sup>-1</sup> .66	
Figura 20 - Cromatogramas das concentrações da curva analítica do BPA na faixa de 1 a 100 $\mu$ g.L <sup>-1</sup> .67	
Figura 21 - Coletas nas quais foram detectadas concentrações do BPA nas amostras de água bruta e potável.....	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Substâncias classificadas como desreguladores endócrinos .....	16
Tabela 2 - Compilação da literatura dos efeitos atribuídos aos desreguladores endócrinos .....	19
Tabela 3 - Concentrações máximas ou faixas de concentrações de BPA detectadas em águas superficiais e tratadas de diferentes regiões .....	27
Tabela 4 - Valores de EQ-E2 de amostras de águas superficiais de diferentes locais do mundo .....	31
Tabela 5 - Ensaio de atividade estrogênica do BPA com diferentes cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante, todos usando receptor de estrogênio como via de sinalização e os respectivos valores de potência relativa e CE50 do BPA em trabalhos da literatura.....	31
Tabela 6 - Metodologias empregadas na análise de BPA reportadas na literatura.....	37
Tabela 7 - Pontos de coleta, município e as respectivas coordenadas geográficas .....	38
Tabela 8 - Quantidade de amostras coletadas ao longo das seis coletas realizadas. Coleta em triplicata para a as análises por cromatografia e duplicata para as análises pelo ensaio in vitro YES para cada um dos três pontos amostrados.....	43
Tabela 9 - Condições cromatográficas utilizadas na técnica no sistema CGAR-EM .....	55
Tabela 10 - Parâmetros físico-químicos e suas respectivas metodologias descritas em APHA (2012)	57
Tabela 11 - Coeficientes da curva de calibração e limites de detecção e quantificação do método desenvolvido para análise do BPA.....	68
Tabela 12 - Comparação entre a média das concentrações de BPA determinadas pela cromatografia, o EQ-E2, nas amostras de água bruta (ponto 1 e 2) e potável (ponto 3) , o EQ-E2 do BPA e o índice pluviométrico do período de cada coleta.....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
Ab <sub>S</sub> corrigida	Absorbância corrigida
ANA	Agencia Nacional de Águas
APHA	<i>American Public Health Association</i>
BPA	Bisfenol A
CAS	Chemical Abstracts Service
CEDAE	Companhia de Saneamento do Estado do Rio de Janeiro
CE <sub>50</sub>	Concentração Efetiva que elucida 50 % do efeito, em relação à curva dose-resposta
CG	Cromatografia gasosa
CGAR-EM	Cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CPRG	cloro fenol vermelho-β-D-galactopiranosida
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DE	Desreguladores endócrinos
DEHP	Bis(2-etil-hexil) ftalato
EC	Eletroforese capilar
EFS	Extração em fase sólida
EFSA	European Food Safety Authority
EQ-E <sub>2</sub>	Equivalentes de estradiol
ERE	Elemento de resposta ao estrogênio
ETE	Estação de tratamento de esgoto
FLU	Fluorescência
INEA	Instituto Estadual do Ambiente
IPCS	<i>International Programme on Chemical Safety</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
PBB	Polybrominated biphenyls

PCB	Polychlorinated biphenyl
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Receptor de estrogênio
REh	Receptor de estrogênio humano
UNEP	United Nations Environment Programme
US. EPA	United States Environmental Protection Agency
UV	Ultravioleta
VTG	Vitelogenina
WHO	World Health Organization
YES	<i>Yeast estrogen screen</i>
DES	Dietilstilbestrol

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	13
1. OBJETIVOS .....	14
1.1. Objetivo geral.....	14
1.2. Objetivos Específicos.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1. Desreguladores endócrinos .....	15
2.2. Atividade Estrogênica .....	20
2.3. Bisfenol A .....	22
2.3.1. Fontes de exposição .....	22
2.3.2. Mecanismo de ação e atividade estrogênica.....	23
2.3.3. Efeitos e Legislação .....	24
2.3.4. BPA em amostras ambientais.....	26
2.4. Ensaio utilizado na avaliação da atividade estrogênica.....	29
2.5. Métodos analíticos para análise de DE.....	33
2.5.1. Extração em Fase Sólida (EFS).....	33
2.5.2. Técnicas analíticas cromatográficas.....	34
2.6. Métodos analíticos empregados na determinação do BPA .....	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	38
3.1. Área de estudo.....	38
3.2. Reagentes e solventes.....	41
3.3. Limpeza e descontaminação de vidrarias .....	41
3.4. Coletas.....	42
3.5. Filtração.....	43
3.6. Extração em Fase Sólida (EFS).....	44
3.7. Ensaio <i>in vitro</i> YES.....	46
3.7.1. Preparação das soluções utilizadas no ensaio.....	47
3.7.2. Cepa da levedura ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) Recombinante.....	47
3.7.3. Preparo da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) Recombinante.....	47
3.7.4. Preparação do meio de análise .....	48
3.7.5. Preparação da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) no dia ensaio .....	49
3.7.6. Procedimento do ensaio <i>in vitro</i> YES .....	49
3.7.7. Análise dos Dados.....	52
3.8. Análises cromatográficas .....	55

3.8.1.	Otimização do método cromatográfico .....	55
3.8.2.	Construção da curva analítica.....	56
3.8.3.	Determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) e linearidade do método. ....	56
3.9.	Parâmetros físico-químicos .....	56
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	57
4.1.	Ensaio <i>in vitro</i> YES.....	57
4.1.1.	Controle positivo 17 $\beta$ -estradiol.....	58
4.1.2.	Atividade estrogênica do composto BPA pelo ensaio <i>in vitro</i> YES.....	59
4.1.3.	Determinação da atividade estrogênica das amostras de água bruta e potável. ....	61
4.1.4.	Comparação com outros trabalhos da literatura .....	63
4.2.	Análises cromatográficas do BPA no rio Guandu.....	64
4.2.1.	Limites de detecção e quantificação do método.....	68
4.2.2.	Identificação e quantificação do BPA em amostras de água bruta do rio Guandu e água potável por CGAR- EM – MSI. ....	68
4.3.	Compilação dos resultados do ensaio YES com os da cromatografia.....	70
4.4.	Caracterização físico-química das amostras.....	72
5.	CONCLUSÃO .....	74
	SUGESTÕES FUTURAS .....	75
	REFERÊNCIAS .....	76
	ANEXO I - Protocolo de Preparação das soluções do ensaio <i>in vitro</i> YES.....	84
	ANEXO II - Parâmetros físico-químicos das amostras de água bruta e potável.....	87
	ANEXO III - Curvas dose-resposta das amostras de água bruta e potável do rio Guandu.....	88

## INTRODUÇÃO

O aumento da ocupação urbana somado às atividades antrópicas atuais como indústria, agropecuária, mineração, energia, dentre outras, são responsáveis por alterar a qualidade e a quantidade dos recursos hídricos disponíveis. Mesmo em um país que possui 12% da disponibilidade de água doce do mundo, os recursos hídricos brasileiros sofrem grande ameaça principalmente pela falta de acesso à rede de esgoto e pela correta destinação de águas residuais (ANA, 2012).

Segundo a Companhia de Saneamento do Estado do Rio de Janeiro (CEDAE, 2014), o índice de cobertura dos serviços de esgoto na cidade do Rio de Janeiro foi de 35,1% em 2014. A ineficiência do sistema de coleta e tratamento somada a ineficácia de remoção de substâncias químicas presentes nos esgotos são uma das rotas de transporte de contaminantes aos corpos hídricos, os quais podem ter suas águas captadas para abastecimento público (PÁDUA, 2012). Dentre este grupo de contaminantes está presente uma categoria recente de micropoluentes, denominada desreguladores endócrinos.

Desreguladores endócrinos (DE) ou xenoestrogênios são compostos naturais ou sintéticos que tem a capacidade de desregular funções endócrinas, imitando ou bloqueando a função normal de hormônios endógenos (SCHUG et al., 2011). O Bisfenol A (BPA), objeto de estudo do presente trabalho, é um conhecido desregulador endócrino utilizado na produção de plásticos e resinas e sua presença no ambiente natural é proveniente da lixiviação ou degradação de plásticos (MERCEA, 2009). O BPA é liberado de produtos de consumo sendo detectável em alimentos, água potável, águas residuais, ar e poeira (VANDENBERG et al 2007).

A literatura reforça a afirmação de que a exposição ambiental ao BPA pode ser nociva para a saúde humana. Segundo uma revisão apresentada por Rochester (2013), o BPA pode apresentar potente desregulação endócrina, além do fato de ser onipresente em humanos e ser suspeito de causar outros efeitos associados, como problemas de saúde no período perinatal, na infância e na idade adulta, incluindo efeitos no desenvolvimento, no processo reprodutivo, no metabolismo, dentre outros.

Ainda que não esteja tão clara a associação entre a exposição ambiental ao BPA e os efeitos a ele previamente relacionados, existe um aumento no número de estudos investigando essa associação. Nesse contexto, a presente dissertação é uma contribuição para o aumento de informações acerca do BPA em águas superficiais e potáveis. Dessa forma, fica evidenciada a relevância de se conhecer as concentrações nas quais o BPA está presente e o potencial destas em causar atividade estrogênica nas águas utilizadas para abastecimento da região metropolitana do Rio de Janeiro.

## **1. OBJETIVOS**

### **1.1. Objetivo geral**

Avaliar a presença do desregulador endócrino Bisfenol A em amostras de água bruta e potável provenientes do rio Guandu, localizado no estado do Rio de Janeiro, além de avaliar a atividade estrogênica das amostras de água.

### **1.2. Objetivos Específicos**

- Otimizar uma metodologia analítica para quantificação do bisfenol A, utilizando a técnica de extração em fase sólida (EFS) e determinação por cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas (CGAR-EM);
- Avaliar a atividade estrogênica das amostras pelo ensaio *in vitro* YES;
- Correlacionar as concentrações obtidas do BPA com a atividade estrogênica e com o índice pluviométrico.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Desreguladores endócrinos

Atualmente existe uma infinidade de substâncias químicas disponíveis comercialmente, que são utilizadas nas indústrias de medicamentos, produtos de higiene pessoal, defensivos agrícolas, alimentos, produtos de limpeza, dentre outras indústrias químicas. Segundo o Chemical Abstracts Service (CAS), até o presente momento existem mais de 107 milhões de substâncias químicas orgânicas e inorgânicas registradas e aproximadamente 15.000 novas substâncias sendo adicionadas a cada dia (CAS, 2016).

Todas essas substâncias vêm sendo introduzidas no meio ambiente há algumas décadas, expondo os seres humanos e animais ao contato e a possíveis efeitos. Porém, um grupo específico de substâncias, os chamados desreguladores endócrinos (DE), tem recebido maior atenção da comunidade científica por serem capazes de causar desequilíbrios no sistema endócrino de humanos e animais e, com isso, afetar a saúde, o crescimento e a reprodução, mesmo em concentrações relativamente baixas, na ordem de  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e  $\text{ng.L}^{-1}$  (BILA & DEZOTTI, 2007).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency - U.S EPA), define os DE como sendo: *“substâncias exógenas que interferem nos processos endócrinos de síntese, secreção, transporte, metabolismo, ação de ligação ou eliminação de hormônios naturais que estão presentes no organismo e são responsáveis pela homeostase, reprodução, e processos de desenvolvimento”* (U.S EPA, 1997).

Fazem parte dos DE as substâncias químicas sintéticas de uso industrial como solventes, lubrificantes e seus subprodutos como bifenilas policloradas (PCB), bifenilas polibromadas (PBB), dioxinas; plásticos, como bisfenol A (BPA), plastificantes (ftalatos); pesticidas como metoxicloro, clorpirifos, diclorodifeniltricloroetano (DDT); fungicidas como vinclozolina; substâncias farmacêuticas como dietilestilbestrol (DES) e substâncias naturais, como as isoflavonas, que fazem parte do grupo dos fitoestrogênios, e existem em quantidades consideráveis em certas plantas como a soja (DIAMANTI-KANDARAKIS, 2009). A Tabela 1 exibe as substâncias consideradas DE.

Tabela 1 - Substâncias classificadas como desreguladores endócrinos

<b>Ftalatos</b>	<b>Metais pesados</b>
dimetil ftalato (DMP) dietil ftalato (DEP) di-iso-butil ftalato (DIBP) di-n-butil ftalato (DBP) butilbenzil ftalato (BBP) dicicloexilo ftalato (DCHP) di-(2-etil-exil) ftalato (DEHP) di-n-octil ftalato (DOP) di-isooctil ftalato (DIOP) di-iso-nonil ftalato (DINP) di-iso-decil ftalato (DIDP)	cádmio Mercúrio chumbo zinco
	<b>Pesticidas</b>
	<i>Inseticidas:</i>
	<i>Fungicidas:</i>
	DDT (2,2 bis-p-clorofenil-111-tricloroetano) DDE (2,2 bis-p-clorofenil-11-dicloroetileno) deltametrin carbofurano <i>Herbicidas:</i> altrazina linuron
	vinclozolina carbendazime penconazol procloraz propiconazol epoxiconazol
<b>Alquifenóis</b>	<i>Pesticidas organoclorados:</i>
nonilfenol nonilfenol etoxilado octilfenol octilfenoletoxilado	lindane (1,2,3,4,5,6-hexacloroexano)
	<b>Compostos orgânicos de estanho</b>
	tribulestanho (TBT) e trifenilestanho (TPT)
	<b>Policlorados de bifenilas</b>
<b>Organoclorados</b>	2,4,4'-triclorobifenil 2,2',5,5'-tetraclorobifenil 2,3',4,4',5-pentaclorobifenil 2,2',3,4,4',5'-hexaclorobifenil 2,2',4,4',5,5'-hexaclorobifenil 2,2',3,4,4',5,5'-heptaclorobifenil
dibenzo-p-dioxina TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina) TCDF (2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano)	
<b>Bisfenol</b>	
bisfenol A	
<b>Parabenos</b>	<b>Retardantes de chama bromado</b>
Benzilparabeno isobutilparabeno butilparabeno n-propilparabeno etilparabeno metilparabeno	Polibromobifenila (PBB) 2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter (BDE 47) 2,2',4,4',5-pentabromodifenil éter (BDE 99) 2,2',4,4',6-pentabromodifenil éter (BDE 100) 2,2',4,4',5,5'-hexabromodifenil éter (BDE 153) 2,2',4,4',5,6'-hexabromodifenil éter (BDE 154) 2,2',3,4,4',5,6'-heptabromodifenil éter octabromodifenil éter (BDE octa) decaclorodifenil éter (BDE 209) hexabromociclododecano (HBCD) tetrabromobisfenol A (TBBA)
<b>Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos</b>	<b>Fitoestrogênicos</b>
naftaleno acenaftileno acenafteno fluoreno fenantreno antraceno fluoranteno pireno benzo[a]antraceno criseno benzo[b]fluoranteno benzo[k]fluoranteno benzo[a]pireno	Isoflavona: daidzeína e genisteína. Lignan: metaresinol e enterodiol
	<b>Agentes terapêuticos e farmacêuticos</b>
	dietilestilbestrol (DES) 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2)
	<b>Estrogênios naturais</b>
	estrone (E1) 17 $\beta$ -estradiol (E2)

Fonte: Bila e Dezotti, 2007.

Os DE podem ser encontrados em algumas matrizes ambientais, tais como: águas superficiais e de subsolo, sedimentos marinhos, solo, efluentes de estação de tratamento de esgoto (ETE) e lodo biológico das ETE. As concentrações dessas substâncias, apesar de baixas, são relevantes (BILA e DEZOTTI, 2003), podendo afetar a qualidade da água, a saúde dos ecossistemas e potencialmente impactar o suprimento de água potável.

Uma das formas de contato, o meio aquático, pode se tornar uma fonte de exposição em função da erosão e do carreamento de partículas de solo contaminado, e pela incompleta remoção dos contaminantes durante os processos de tratamento de esgoto, com a conseqüente descarga desses componentes para dentro dos corpos hídricos (VEERASINGAM e ALI, 2013).

Os DE não são removidos completamente por processos de tratamentos convencionais, sendo necessária a aplicação de técnicas avançadas de tratamento, tais como, filtração em membrana de nanofiltração (NF) e osmose reversa (OR), ozonização ou processos oxidativos avançados. No entanto, o que existe no Brasil ainda é a prevalência do tratamento convencional (BILA e DEZOTTI, 2007).

Os DE podem entrar em contato com os seres humanos e com o meio ambiente de diversas formas. A exposição a essa variedade de substâncias pode ser através da ingestão de água e alimentos contaminados, inalação de ar contaminado, do contato com o solo exposto a uma série de pesticidas, plastificantes, alquilfenóis e retardadores de chama, que são compostos usados na agricultura, indústria e no uso doméstico (KABIR et al., 2015).

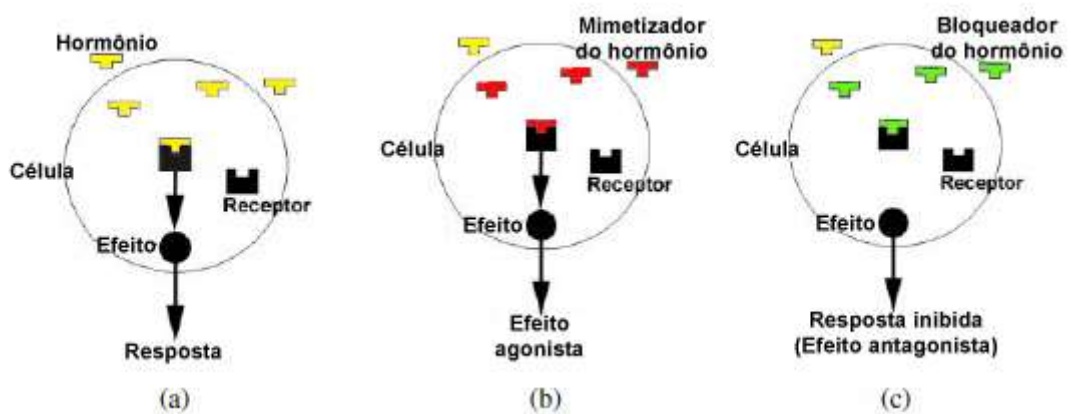
Quando em contato com os seres vivos, os DE agem no sistema endócrino, o qual é formado por um conjunto de glândulas responsáveis pela produção dos hormônios, que são moléculas encarregadas de fazer a comunicação e interação entre os órgãos e sistemas do organismo. Os hormônios induzem efeitos em células e tecidos especificamente através dos mecanismos de sinalização que normalmente envolvem os receptores hormonais (UNEP e WHO, 2013), os quais incluem receptores de estrogênio, de androgênio, da progesterona, da tireoide, dentre outros (E. DIAMANTI-KANDARAKIS, 2009).

Esses compostos exibem características estruturais semelhantes às dos hormônios, e por isso tem a capacidade de agir no sistema endócrino ao mimetizar ou bloquear a ação dos

hormônios naturais do organismo, influenciando no aumento ou diminuição da quantidade destes, e dessa forma alterando as funções endócrinas (SANTAMARTA, 2001).

A desregulação endócrina ocorre quando DE interagem com os receptores de estrogênio (RE), alterando os padrões de resposta naturais do sistema endócrino. Quando essa interação ocorre e o DE mimetiza a ação dos hormônios naturais, como os estrogênios, androgênios e da tireóide, e ativam uma resposta, ocorre um efeito denominado agonista. Porém, quando o DE se liga ao receptor e bloqueia a ligação do hormônio natural, impedindo a propagação do sinal, de modo que nenhuma resposta é elucidada, esse efeito é denominado antagonista (BIRKETT e LESTER, 2003). A Figura 1 mostra um dos mecanismos de ação dos DE.

Figura 1 - Processo de desregulação endócrina.



Legenda: (a) Resposta natural; (b) Efeito agonista; (c) Efeito antagonista.

Fonte: Adaptado de BIRKETT e LESTER, 2003.

Ao interferir no sistema endócrino, esses compostos podem causar efeitos adversos, tais como problemas morfológicos e fisiológicos no sistema reprodutivo em humanos e animais, perturbações no sistema imune, processo de feminização de animais, hermafroditismo, deformidades nos órgãos reprodutivos, dentre outros. Em alguns casos, esses efeitos podem conduzir a mudanças na dinâmica e culminar no declínio das populações. A Tabela 2 apresenta alguns dos efeitos destas substâncias descritos na literatura.

Tabela 2 - Compilação da literatura dos efeitos atribuídos aos desreguladores endócrinos

<b>Grupo</b>	<b>Composto(DE)</b>	<b>Efeitos/Organismo</b>	<b>Referência</b>
<b>Poluentes Orgânicos Persistentes (POP's)</b>	PCB	-Possível endometriose e fibromas em seres humanos; -Supressão do hormônio da tireóide em todas as classes de vertebrados; - Causa provável de declínio da população em aves e mamíferos que se alimentam de peixe;	ROBERTSON e HANSEN, 2001; IPCS, 2003; UNEP e WHO, 2013.
	DDT (banido)	-Possível causa de endometriose -Diminuição da espessura da casca dos ovos, -Feminização, comportamento homossexual e declínio da população em aves. -Redução da testosterona e desmasculinização em ursos polares e jacarés e intersex em peixes e rãs.	IPCS, 1995; WHO, 2013.
<b>Ftalatos</b>	DEHP	-Ampla evidência para distúrbio da capacidade reprodutiva em roedores; -Redução de testosterona, anomalia do desenvolvimento e redução da qualidade do sêmen.	IARC, 2000; LYCHE et al., 2009.
<b>Alquifenóis</b>	Nonilfenol	-Indução da síntese de vitelogenina (VTG) em répteis e peixes machos; -Diminuição da produção de espermatozoides em homens	TESKE e ARNOLD, 2008; VERDERAME et al., 2011
<b>HPA</b>	Benzo[a]pireno	-Potencialmente mutagênicos e carcinogênicos; Neoplasias em organismos aquáticos.	PEREIRA NETTO et al., 2000; SROGI, 2007.
<b>Pesticidas (em uso atual)</b>	Atrazina	-Intersex em sapos; - Depressão da função imune de roedores adultos quando expostos no período pré-natal e lactação	GIDDINGS et al., 2005; US. EPA, 2006

Tabela 2 - Compilação da literatura dos efeitos atribuídos aos desreguladores endócrinos (conclusão)

<b>Grupo</b>	<b>Composto(DE)</b>	<b>Efeitos/Organismo</b>	<b>Referência</b>
<b>Metais</b>	Metilmercúrio	-Alterações no comportamento reprodutivo de peixes e anfíbios para o sucesso da reprodução; - Interferência no sucesso reprodutivo de aves marinhas devido a efeitos perturbadores neuroendócrinos no comportamento de corte e escolha do companheiro	PACYNA et al., 2010; DIETZ, et al., 2009;
<b>Hormônios naturais</b>	17 $\beta$ -estradiol	-Feminização de peixes machos; Hermafroditismo; Indução da síntese de VTG.	KÖGER et al., 2000; RODGER-GRAY et al., 2001; SIFUENTES-ROMERO et al., 2006.
<b>Hormônios sintéticos</b>	17 $\alpha$ -etinilestradiol	-Indução da síntese de VTG; Câncer de próstata em homens.	ROSE et al., 2002; TESKE e ARNOLD, 2008

Fonte: O autor, 2016.

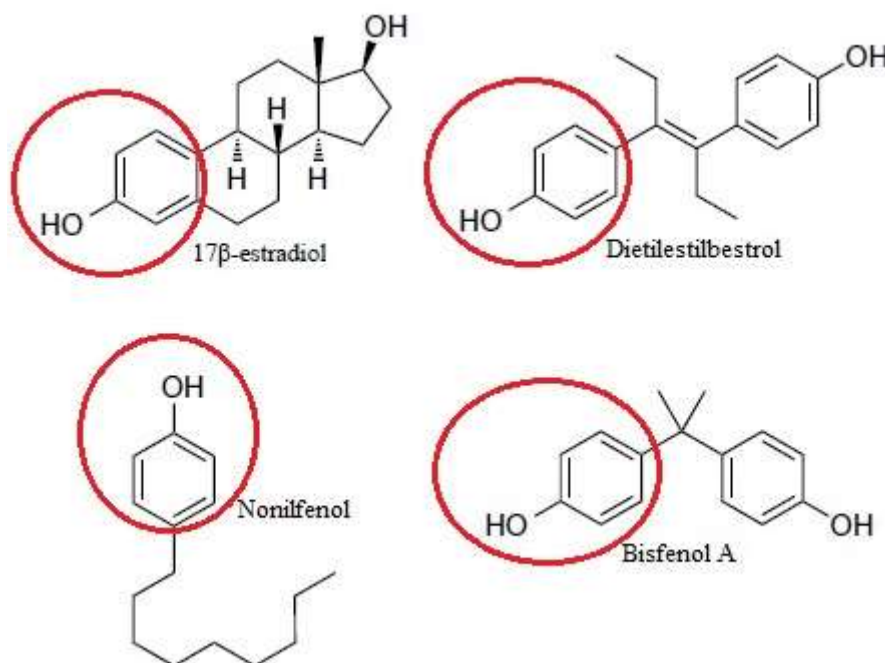
## 2.2. Atividade Estrogênica

Os DE que apresentam atividade estrogênica são aqueles que interagem com o receptor de estrogênio (RE) da célula. As substâncias que não interagem com o RE podem ser consideradas DE se causarem prejuízo ao sistema endócrino, no entanto, seu mecanismo de ação não é através do RE. As substâncias estrogênicas podem ser classificadas como naturais ou sintéticas. As substâncias naturais também podem ser chamadas de estrógenos endógenos, pois são produzidos naturalmente pelo corpo, como o 17 $\beta$ -estradiol e a estrona. Por outro lado, as substâncias sintéticas também são conhecidas como xenoestrógenos, pois são derivadas de atividades antrópicas, tais como o 17 $\alpha$ -etinilestradiol, bisfenol A, os ftalatos, os PCB, certos pesticidas, dentre outros (BECK et al., 2006; YANG, J., 2014).

O termo substância estrogênica refere-se à substância cujo efeito se dá através do RE, iniciando uma cascata de efeitos específicos no tecido/célula similar aos iniciados pelo 17 $\beta$ -estradiol (principal e mais potente estrogênio natural). Esse mecanismo de ligação entre uma substância e o RE é denominado atividade estrogênica (BILA, 2005). Os receptores hormonais incluem os receptores da superfície celular e nucleares, sendo estes últimos os receptores para os estrogênios, androgênios e progesterona (KORTENKAMP et al., 2012).

A possibilidade de estrogenicidade de uma substância pode ser analisada através da comparação entre a estrutura química do 17 $\beta$ -estradiol com a estrutura química do DE, na qual deve-se observar em comum o grupo fenólico, que é considerado como sendo crucial para a alta afinidade da ligação da substância ao receptor de estrogênio, traduzindo-se na ocorrência de estrogenicidade *in vivo* (BIRKETT e LESTER, 2003; KIDD et al., 2012). Na Figura 2 está apresentada a estrutura química de alguns compostos estrogênicos, com destaque para o grupamento OH semelhante das substâncias.

Figura 2 - Estrutura química de alguns compostos estrogênicos, incluindo o natural 17- $\beta$  estradiol.



Fonte: Adaptado de KIDD et al., 2012.

### 2.3. Bisfenol A

O bisfenol A (BPA; 2,2-bis(4-hidroxifenil) propano; Número de Registro CAS 80-05-7) é um monômero que foi sintetizado pela primeira vez em 1891 pelo químico russo Alexander P. Dianin, por meio de uma reação de condensação de duas moléculas de fenol e uma molécula de acetona na presença de um catalisador, como cloreto de hidrogênio ou resina de permuta iônica. (RUBIN, 2011).

Na indústria, o BPA pode ser utilizado como um componente intermediário na síntese de policarbonatos e resinas epóxi. Também é adicionado ao final da produção de adesivos, tintas em pó, lentes de automóveis, vidraças de proteção, materiais de construção, discos compactos, lentes ópticas, papel térmico, revestimentos de papel, encapsulamento de componentes elétricos e eletrônicos (STAPLES et al., 1998) e na composição de selantes dentários à base de resina e nas colas usadas em procedimentos dentários (PULGAR et al., 2000). O policarbonato é um tipo de plástico transparente, duro e rígido, o qual é autoclavável, não tóxico e o mais resistente dentre todos os demais termoplásticos, o que contribui para a diversidade de aplicações que ele apresenta.

A diversidade de aplicações do BPA contribuiu para o aumento na produção comercial do setor industrial, que começou em 1950 e nos últimos anos demonstra demanda crescente, impulsionada principalmente pelo mercado asiático (especialmente a China). (HOEKSTRA e SIMONEAU, 2013).

#### 2.3.1. Fontes de exposição

A demanda crescente e a larga utilização do BPA traz a tona o questionamento acerca do destino final de toda a quantidade produzida ao longo dos anos. Por ter uso doméstico e industrial, o BPA pode ser encontrado em diversas matrizes, como alimentos, água potável, poeira, águas superficiais e esgotos domésticos (ZAFRA-GÓMEZ et al., 2008; (MICHAŁOWICZ, 2014). Como outros DE no Brasil, o BPA não é removido pelos processos



de tratamento comumente empregados, e por isso os efluentes contendo BPA podem se tornar uma fonte de contaminação do ambiente aquático (LEE e PEART 2000).

Outra forma de contaminação é por meio de alimentos contaminados, isso porque o BPA está presente em várias embalagens de plástico, especialmente nas de alimentos enlatados que possuem revestimento de resinas epóxi e que são utilizadas para armazenar sopas, legumes, etc. O revestimento é utilizado para impedir o contato do alimento com a lata. No entanto, uma vez em contato direto com os alimentos, o BPA pode migrar para estes e, finalmente, para o ser humano (GORE et al., 2014).

A exposição a estas fontes implicam na contaminação de animais e seres humanos. Isto se confirma através de estudos que apontam que o BPA foi medido em tecidos e fluídos corporais, como urina, sangue humano, leite materno, fluído amniótico, e tecido placentário, indicando que o feto humano em desenvolvimento pode ser exposto ao BPA (CALAFAT et al., 2005; INOUE et al., 2001; SUN et al., 2004; IKEZUKI et al., 2002).

### **2.3.2. Mecanismo de ação e atividade estrogênica**

A atividade estrogênica referente ao BPA, ou seja, a capacidade do composto em mimetizar o  $17\beta$ -estradiol, foi descoberta em 1930 através de uma investigação acerca de substâncias capazes de estimular o sistema reprodutivo feminino de camundongos. Em 1993, em um estudo realizado por Krishnan et al. (1993), a atividade estrogênica do BPA foi descoberta ocasionalmente, quando pesquisadores da Universidade de Stanford observaram que a substância estrogênica no meio de cultivo não era produto do cultivo da levedura, mas sim da liberação da substância a partir dos frascos de policarbonato utilizados no processo de autoclavagem, que posteriormente foi purificada e detectada como sendo BPA.

Mesmo não sendo bioacumulativo e persistente no organismo humano, (VOKEL et al., 2002), uma vez presente nos tecidos e fluídos corporais, o BPA pode interagir com os sítios receptores da célula, incluindo os receptores de estrogênio e de androgênio, que são associados aos hormônios do sistema endócrino e de outros sistemas do organismo (KRISHNAN et al., 1993; ROGERS et al., 2013). Portanto, o BPA pode apresentar tanto ação antiestrogênica, (quando o BPA, ao competir com o  $E_2$  endógeno, bloqueia a resposta

estrogênica) (RICHTER et al., 2007; BONEFELD-JORGENSEN et al., 2007), quanto anti-androgênica, (quando o BPA, ao competir com os andrógenos, bloqueia a ação androgênica endógena (WETHERILL et al., 2007 ; SOHONI & SUMPTER 1998).

Foi relatado na literatura que o BPA pode afetar o funcionamento da tireóide, provocando efeitos agonistas e antagonistas e também interagir com outros órgãos e sistemas fisiológicos, incluindo o sistema nervoso central, o pâncreas e o sistema imunológico (WETHERILL et al., 2007).

### 2.3.3. Efeitos e Legislação

Os efeitos decorrentes da desregulação endócrina causada pelo BPA já foram constatados por ensaios *in vivo* e *in vitro*, sendo a maioria dos testes realizada em camundongos. Já foram constatados efeitos como aumento de peso da próstata em camundongos, dilatação vaginal e puberdade precoce nas descendentes de camundongos fêmeas grávidas expostas a doses ambientalmente relevantes de BPA, além de um envelhecimento reprodutivo avançado (MARKEY et al., 2001). Em outro estudo com camundongos, a exposição ao BPA causou alterações na estrutura e funções cerebrais devido ao efeito deste composto nos receptores hormonais e neuro-hormonais, além de perturbar o desenvolvimento de órgãos reprodutores, a excreção de testosterona e a produção de esperma (RICHTER et al., 2007).

Os efeitos ecotoxicológicos provocados pelo BPA incluem a redução da fertilidade e da qualidade do esperma, a inibição da ovulação em várias espécies de peixes, alteração no desenvolvimento da cauda em girinos de algumas espécies de rãs, e anomalias no desenvolvimento dos otólitos do peixe-zebra durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (GIBERT et al., 2011).

Segundo a revisão realizada por Rochester, (2013), o BPA pode estar associado a uma redução do sucesso do processo de fertilização *in vitro* e da qualidade do embrião, à falha no processo de implantação, ao aborto espontâneo, ao parto prematuro, à redução da função sexual masculina, à redução da qualidade do esperma, à alteração das concentrações de

hormônios sexuais, da tireoide, à doença cardiovascular, alteração da função hepática, obesidade, alteração da expressão gênica, dentre outros. Além disso, a exposição ao BPA durante a gestação pode resultar em um aumento de aborto espontâneo, tempo de gestação anormal, peso reduzido, anormalidades nos genitais masculinos e obesidade infantil.

As crianças representam um grupo de risco aos DE se comparado aos adultos porque a relação entre os alimentos ingeridos e o peso corporal é maior, o que possibilita uma maior quantidade relativa de ingestão de substâncias tóxicas e possível acumulação, o que pode acarretar danos aos sistemas fisiológicos do neurodesenvolvimento (CASTRO-CORREIA e FONTOURA, 2015). Da mesma forma, fetos e recém-nascidos metabolizam BPA menos eficientemente do que os adultos, e, portanto, podem ser mais sensíveis à toxicidade causada por esse composto (DOMORADZKI et al., 2004).

Os resultados obtidos por Nam et al. (2010) mostraram que o aumento da temperatura de mamadeiras e o uso prolongado desses utensílios aumenta a hidrólise dos polímeros constituintes desses objetos, causando uma maior migração de BPA para a água. Visto isso, alguns países como Canadá e alguns estados dos EUA baniram o BPA das mamadeiras e de outros produtos para crianças e bebês (EFSA, 2008). No Brasil, a Resolução - RDC N° 41 (BRASIL, 2011a) proíbe a fabricação e importação de mamadeiras contendo BPA para o Brasil. No entanto, para as concentrações de BPA em águas e alimentos o Brasil não dispõe de legislação atual para regulação. Já na União Europeia o limite atualmente aceito de migração do BPA de policarbonatos e resinas para alimentos é de  $30 \mu\text{g.L}^{-1}$  de BPA (VOM SAAL et al., 2005).

A presença de substâncias químicas que são atualmente consideradas DE em água ainda é pouco regulamentada. A respeito desse fato, a União Europeia avaliou 553 compostos relacionadas à capacidade de desregulação endócrina e o BPA foi classificado na categoria 1 (onde há clara evidência de efeitos de desregulação endócrina num organismo intacto) (EC, 2007). Já na Diretiva 2008/105/CE (EUROPEAN PARLIAMENT AND COUNCIL, 2008) sobre o domínio da política da água do Parlamento Europeu, o BPA está incluído na lista de substâncias sujeitas a revisão para eventual identificação como substâncias prioritárias ou perigosas. Mesmo que até a presente data esta revisão tenha concluído que não há provas suficientes de um risco significativo para o ambiente aquático, a Comissão Europeia reavalia periodicamente as informações disponíveis e faz as modificações caso sejam atribuídos novos indícios às substâncias em análise.

Mesmo sendo relatado na literatura, pelos ensaios *in vivo* e *in vitro* que o BPA causa efeitos estrogênicos, hepatotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos, não existem evidências suficientes para se afirmar se as concentrações do BPA geralmente determinadas no ambiente e / ou no organismo humano (sangue, urina) são capazes de causar esses efeitos em seres humanos, já que as concentrações geralmente testadas nos ensaios são muito superiores às aquelas encontradas no meio ambiente (MICHAŁOWICZ, 2014). São necessários estudos mais minuciosos a respeito desse composto em concentrações mais próximas às encontradas em matrizes ambientais para obtenção de resultados mais conclusivos.

#### **2.3.4. BPA em amostras ambientais**

A Tabela 3 apresenta uma compilação de trabalhos de 2006 a 2016 das concentrações de BPA encontradas em águas superficiais e potáveis em vários países.

Tabela 3 - Concentrações máximas ou faixas de concentrações de BPA detectadas em águas superficiais e tratadas de diferentes regiões

<b>Matriz</b>	<b>Concentração</b>	<b>Região</b>	<b>Referência</b>
<b>Águas superficiais</b>	< 0,12 – 18,74 ng.L <sup>-1</sup>	Península Antártica	ESTEBAN et al., 2016
	4–377 ng.L <sup>-1</sup>	China	YANG, J., 2014)
	5,645 a 295,255 µg.L <sup>-1</sup>	Americana, SP	BERALDO, 2012
	2 a 141 ng.L <sup>-1</sup>	Campinas, SP	RAIMUNDO, 2011
	87 ng.L <sup>-1</sup>	Canadá	KLEYWEGT et al., 2011
	2990 ng.L <sup>-1</sup>	China	ZHANG et al., 2011
	68 ng.L <sup>-1</sup>	Itália	LOOS et al., 2010
	1040 ng.L <sup>-1</sup>	China	ZHAO et al., 2009
	2 – 46 ng.L <sup>-1</sup>	Suíça	JONKERS et al., 2009
	106 - 880 ng.L <sup>-1</sup>	Portugal	RIBEIRO et al., 2009
	0,008 a 0,32 µg L <sup>-1</sup>	Espanha	BALLESTEROS-GÓMEZ et al., 2007
	22.000 ng.L <sup>-1</sup>	Holanda	VERLIEFDE et al., 2007
	580 ng.L <sup>-1</sup>	Bélgica	
	360 ng.L <sup>-1</sup>	EUA	STACKELBERG et al., 2007
11,7 a 16,8 µg.L <sup>-1</sup>	Araraquara, SP	LEANDRO, 2006	
<b>Água potável</b>	0,099 µg.L <sup>-1</sup>	América do Norte	ARNOLD et al., 2013
	0,014 µg.L <sup>-1</sup>	Europa	
	0,317 µg.L <sup>-1</sup>	Ásia	
	99 ng.L <sup>-1</sup>	Canadá	KLEYWEGT et al., 2011
	2,3 – 317 ng.L <sup>-1</sup>	China	LI et al., 2010
	25 ng.L <sup>-1</sup>	EUA	BENOTTI et al., 2009
	129 – 136 ng.L <sup>-1</sup>	França	BAUGROS et al., 2008
	< 10 ng.L <sup>-1</sup>	Holanda	VERLIEFDE et al., 2007
6,2 - 7,3 µg.L <sup>-1</sup>	Araraquara, SP	LEANDRO, 2006	

Fonte: O autor, 2016.

No Brasil, os estudos realizados sobre DE são escassos e grande parte deles foram desenvolvidos na região sudeste do país, sendo a maioria no estado de São Paulo, mas englobando o Rio de Janeiro e Minas Gerais (LOUREIRO, 2002; LEANDRO, 2006; GHISELLI, 2007; RAIMUNDO, 2007; GEROLIN 2008; MOREIRA et al., 2009; SODRÉ et al., 2010).

Em relação aos trabalhos realizados no Brasil, mais especificamente em São Paulo, Beraldo (2012) encontrou concentrações máximas de 295,255 µg.L<sup>-1</sup> de BPA em águas

superficiais da cidade de Americana. Em Araraquara, Leandro (2006) constatou a presença do composto na faixa de 11,7 a 16,8  $\mu\text{g.L}^{-1}$  em água bruta e 6,2 e 7,3  $\mu\text{g.L}^{-1}$  na água potável e Raimundo (2011) constatou o BPA em todos os pontos amostrais de água tratada, não apresentando correlação com períodos de seca e cheia dos rios. As concentrações nos mananciais variaram entre 2 e 141  $\text{ng.L}^{-1}$  e na água potável entre 1,5 e 26  $\text{ng.L}^{-1}$ .

Até na região Antártica as concentrações de BPA em águas já foram avaliadas. Esteban et al. (2016) analisou a presença de alguns DE, inclusive do BPA em águas continentais da região da península da Antártica. Para isso, dez amostras de água foram analisadas a partir de uma ampla variedade de fontes, incluindo riachos, lagoas, drenagem de geleiras, e uma descarga de águas residuais urbanas que tem como destino final o mar. Surpreendentemente, as concentrações detectadas foram geralmente semelhantes às encontradas em outros estudos de águas continentais em outras partes do mundo.

No estudo realizado por Verliefde et al. (2007) em mananciais e na água tratada da Holanda, o BPA não foi detectado em concentrações maiores que 10  $\text{ng.L}^{-1}$  para água potável e a concentração máxima foi de 22  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para águas superficiais. Na Bélgica a maior concentração encontrada foi de 580  $\text{ng.L}^{-1}$  em águas superficiais.

Na Espanha, no trabalho realizado por Ballesteros-Gómez et al. (2007) para avaliar uma metodologia simples, rápida e sensível desenvolvida, foram analisadas amostras de BPA em águas superficiais de três rios e em efluentes de antes e depois de uma estação de tratamento municipal na qual a composição dos efluentes é uma mistura de efluentes domésticos e industriais, encontrando uma faixa de concentração de 0,008 a 0,32  $\mu\text{g L}^{-1}$  para as águas, 0,03 a 1,6  $\mu\text{g L}^{-1}$  para os afluentes e 0,02 a 0,36  $\mu\text{g L}^{-1}$  para os efluentes.

Em Portugal as concentrações de BPA encontradas por Ribeiro et al. (2009) variaram na faixa de 106 - 880  $\text{ng.L}^{-1}$  para águas superficiais e na Suíça, Jonkers et al. (2009) encontrou concentrações do BPA que variaram de 2 – 46  $\text{ng.L}^{-1}$  em águas superficiais.

Na China, Zhang et al. (2011) detectaram concentração de BPA de 2,990  $\mu\text{g.L}^{-1}$  no rio urbano Jialu, o qual recebe em suas águas efluentes da região central da China. Zhao et al. (2009) analisou águas superficiais de três rios e constatou que a maior concentração encontrada foi de 1,040  $\mu\text{g.L}^{-1}$  no rio Shijing, poluído pelos efluentes das cidades vizinhas. Já Yang et al. (2014) detectou uma faixa menor de concentração, de 4 a 377  $\text{ng.L}^{-1}$  no delta do rio das Pérolas, no sul da China.

Para água potável, Arnold et al. (2013) realizaram um estudo detalhado, no qual analisaram 65 artigos, sendo 31 na América do Norte, 17 na Europa e 17 na Ásia, com o objetivo de avaliar a relevância da água potável como uma fonte de exposição humana ao BPA e a possíveis efeitos. As concentrações máximas quantificadas (acima do limite de detecção) de BPA foram de 0,099  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para América do Norte, 0,014  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para Europa e 0,317  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para a Ásia.

Baugros et al. (2008) determinaram o BPA na água tratada da França em concentrações entre 129 e 136  $\text{ng.L}^{-1}$  e Verliefe et al. 2007 não detectaram em concentração maior que 10  $\text{ng.L}^{-1}$ . Nos EUA e Canadá as maiores concentrações encontradas foram de 25 e 99  $\text{ng.L}^{-1}$  respectivamente. Na China foram analisadas amostras de água da torneira por Li et al. (2010), nas quais foi encontrado BPA na faixa de 2,3 a 317  $\text{ng.L}^{-1}$ .

#### **2.4. Ensaios utilizados na avaliação da atividade estrogênica**

É importante e necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas e técnicas de monitoramento para avaliar os efeitos dos DE em organismos. Para atender a este propósito, são utilizados ensaios *in vitro* e *in vivo*.

De uma forma geral, ensaios *in vivo* incluem pesagem e histologia de órgãos reprodutivos, níveis de hormônios no sangue, ativação de gene *in vivo*, síntese de proteínas, comportamento, crescimento, desenvolvimento, manutenção da gravidez e anatomia/morfologia. Os métodos dos ensaios *in vitro* incluem proliferação de células animais, ligação nos RE, síntese de hormônios/enzima esteróides, ensaio de gene repórter recombinante e análises bioquímicas (GRAY et al., 1997).

Entre os ensaios *in vivo* para a identificação de substâncias estrogênicas, são ressaltados os ensaios em roedores e o ensaio da indução da síntese de vitelogenina (VTG). No ensaio em roedores, destacam-se o ensaio uterotrófico, que avalia a alteração do peso uterino e o ensaio de cornificação da mucosa vaginal, que avalia mudanças histológicas nas células epiteliais da mucosa vaginal (BAKER, 2001). No ensaio de VTG, os bioensaios são realizados com algumas espécies de peixes, com a utilização da vitelogenina (VTG), uma lipoproteína complexa que desempenha um importante papel no sistema reprodutivo de

vertebrados ovíparos fêmeas. É sintetizada no fígado, regulada por estrogênio e transportada através do sangue para os ovários, onde são incorporados no desenvolvimento dos óvulos. De um modo geral, o gene da VTG também está presente em organismos machos, mas sob condições normais não é expressivo, possivelmente, pela baixa concentração de estrogênio no sangue. Desta forma, o aumento de VTG no plasma de um organismo é considerada uma evidência da exposição a substâncias com atividade estrogênica (HANSEN et al., 1998; FOLMAR et al., 1996).

Os ensaios *in vitro* mais utilizados para avaliar atividade estrogênica englobam ensaios de interação com receptores hormonais (determinam a capacidade de uma substância acoplar-se aos receptores hormonais), ensaios de proliferação de células (capacidade de uma substância em estimular o crescimento de células sensíveis a estrogênios), ensaios de gene repórter em células de mamíferos ou leveduras (capacidade de uma substância em estimular a transcrição do gene repórter inseridos nas células) (BAKER, 2001).

Os ensaios *in vitro* mais referenciados são o E-screen e os que utilizam cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes e apresentam o receptor de estrogênio como via de sinalização, sendo o ensaio *in vitro* YES o mais utilizado dentre esses.

O ensaio E-screen utiliza a proliferação celular para determinar a estrogenicidade da amostra. É realizada a quantificação da mitose de células cancerígenas mamárias (MCF-7), quando em contato com compostos estrogênicos (SOTO et al., 1995). A mensuração da proliferação das células é determinada pela contagem do número de células, ou núcleos ou por método colorimétrico (KÖRNER et al., 1998; SOTO et al., 1995).

O ensaio YES, na sua condição de ensaio *in vitro*, apresenta algumas vantagens, tais como: sensibilidade a baixas concentrações, respostas específicas, custo baixo, requer pouca quantidade de amostra, pode ser usado para misturas complexas (águas naturais, lodos biológicos, etc) (BERESFORD et al., 2000).

A mensuração no ensaio YES é colorimétrica, sendo detectada por espectrofotometria. Os resultados obtidos são comparados com os do  $17\beta$ -estradiol, que é o estrogênio humano primário e que representa o maior potencial estrogênico e o padrão pelo qual a atividade estrogênica é expressa, na forma de equivalentes de estradiol (EQ-E<sub>2</sub>). O ensaio permite determinar a atividade estrogênica total de uma amostra, não sendo possível distinguir quais compostos são responsáveis pela atividade estrogênica detectada (ROUTLEDGE e



SUMPTER, 1996). A Tabela 4 apresenta os valores EQ-E<sub>2</sub> de amostras de águas superficiais de diferentes regiões. No entanto, ao realizar o ensaio para detectar a atividade estrogênica de uma substância padrão, ou seja, que apresenta uma concentração conhecida, como o BPA, por exemplo, é possível avaliar a potência relativa do padrão em relação ao 17β-estradiol. A Tabela 5 apresenta a potência relativa e o CE<sub>50</sub> do BPA em alguns trabalhos.

Tabela 4 - Valores de EQ-E<sub>2</sub> de amostras de águas superficiais de diferentes locais do mundo

<b>Matriz</b>	<b>EQ-E<sub>2</sub></b>	<b>Referência</b>
Águas superficiais (rio Guandu)	1,3 ng.L <sup>-1</sup>	(DIAS et al., 2015)
Águas superficiais (Espanha)	0,053 a 0,75 ng.L <sup>-1</sup>	(ESTEBAN et al., 2014)
Águas superficiais (Países Baixos)	0 a 1,09 ng.L <sup>-1</sup>	(MURK et al., 2002)
Águas do mar Báltico	0,01 a 0,82 ng.L <sup>-1</sup>	(BECK et al., 2006)
Águas superficiais (China)	0,07 a 8,06 ng.L <sup>-1</sup>	(YANG, J., 2014)
Águas superficiais (Alemanha)	19,42 ng.L <sup>-1</sup>	(PAWLOWSKI et al., 2004)

Fonte: O autor, 2016.

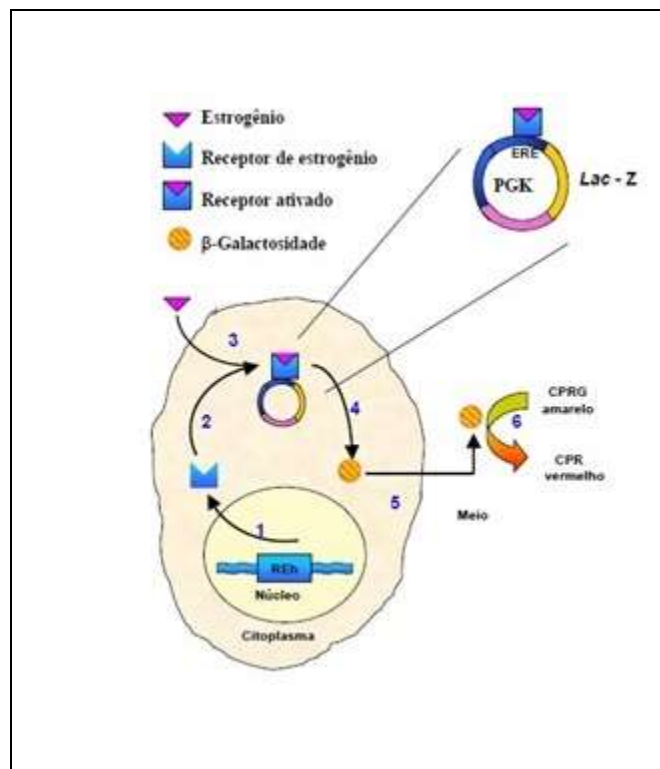
Tabela 5 - Ensaio de atividade estrogênica do BPA com diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, todos usando receptor de estrogênio como via de sinalização e os respectivos valores de potência relativa e CE<sub>50</sub> do BPA em trabalhos da literatura

<b>Substância</b>	<b>CE<sub>50</sub></b>	<b>Potência Relativa</b>	<b>Referência</b>
Bisfenol A	-	1,0 x 10 <sup>-5</sup>	(MURK et al., 2002)
	456580 ng.L <sup>-1</sup>	1,1 x 10 <sup>-4</sup>	(RUTISHAUSER et al., 2004)
	1644 ± 388 μ.g.L <sup>-1</sup>	2,43 x 10 <sup>-5</sup>	(CÉSPEDES et al., 2004)
	342435 ng.L <sup>-1</sup>	1,2 x 10 <sup>-4</sup>	(BECK et al., 2006)
	783034,7 ng.L <sup>-1</sup>	-	(BALSIGER et al., 2010)
	1,87 x 10 <sup>6</sup> ng.L <sup>-1</sup>	9,82 x 10 <sup>-6</sup>	(YANG, R., 2014)
	86944 x 10 <sup>6</sup> ng.L <sup>-1</sup>	-	(RAMIREZ et al., 2014)

Fonte: O autor, 2016.

O ensaio *in vitro* YES é realizado com uma cepa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* modificada geneticamente no Departamento de Genética da Glaxo, Reino Unido, através da integração de uma sequência de DNA do receptor de estrogênio humano (REh) no cromossomo principal da levedura. As células da levedura também contêm plasmídeos de expressão, que possuem o elemento de resposta ao estrogênio (ERE), o qual é portador do gene repórter lac-Z (o qual codifica a enzima  $\beta$ -galactosidase), que vai mediar a mudança de coloração do ensaio. Quando ocorre a ligação de uma substância estrogênica no sítio do receptor, este interage com fatores de transcrição e outros elementos de transcrição para modular a transcrição de genes. Isso causa a expressão do gene repórter lac-Z e conseqüentemente a codificação da enzima ( $\beta$ -galactosidase), a qual é secretada no meio, e é responsável por metabolizar o substrato cromogênico, clorofenol vermelho- $\beta$ -D-galactopiranosida (CPRG), que é normalmente amarelo e muda para a cor rosa (ROUTLEDGE & SUMPTER, 1996). A Figura 4 apresenta um esquema do mecanismo de ação do ensaio.

Figura 3 - Esquema do sistema de expressão de atividade estrogênica pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* recombinante (ensaio YES)



Legenda: 1) O REh é incorporado dentro do genoma da levedura; 2) O RE é ativado através da ligação com uma substância estrogênica, a qual entra na célula e se liga a ele (3); 4) O receptor de estrogênio ativado se liga ao

ERE e o gene repórter lac-z induz a produção da  $\beta$ -galactosidase; 5) A enzima metaboliza o substrato cromogênico e ocorre a mudança na coloração.

Fonte: Adaptado de ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996.

## **2.5. Métodos analíticos para análise de DE**

A identificação e quantificação dos DE no meio ambiente é um desafio devido à complexidade das matrizes ambientais, como águas naturais, sedimento, efluentes domésticos e industriais, que apresentam uma variedade de substâncias, as quais estão presentes em concentrações traço, na faixa de  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e  $\text{ng.L}^{-1}$  e que exigem técnicas analíticas sensíveis, específicas e eficientes para a sua determinação.

Em função dessa complexidade e das baixas concentrações dos compostos de interesse, se faz necessário a eliminação de interferentes, que se inicia antes da coleta, onde normalmente é realizada em frascos de vidro âmbar, os quais são previamente limpos com água ultrapura e solventes orgânicos, como metanol ou acetona. Após a coleta, as amostras devem ser armazenadas a temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ , e a extração deve ser realizada em até 48h (YING, 2007).

As etapas subsequentes à coleta normalmente incluem filtração da amostra através de membranas inertes, usualmente de  $0.45\ \mu\text{m}$  de diâmetro do poro, para remoção de sólidos em suspensão que poderiam comprometer a etapa posterior; ajuste do pH para  $<4$ , pois para compostos fenólicos, como o bisfenol, o pH ácido suprime e previne a ionização dos analitos, aumentando a eficiência da extração e o isolamento e concentração dos analitos de interesse (MOREIRA, 2008; YING, 2007).

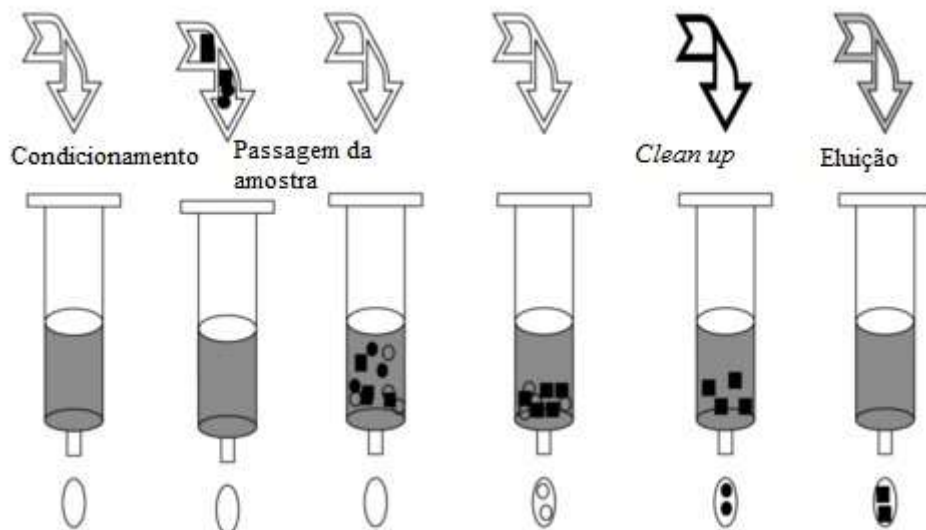
### **2.5.1. Extração em Fase Sólida (EFS)**

Dentre as técnicas de extração e concentração de DE em amostras aquosas, o emprego da extração em fase sólida continua sendo a mais utilizada, sendo relatado na literatura o

emprego de discos e mais comumente cartuchos (YING, 2007; RICHARDSON, 2010). A fase estacionária empregada na EFS deve ser escolhida tendo como base as características dos analitos. A etapa de lavagem (*clean up*) é usualmente requerida, e tem por objetivo eliminar os compostos interferentes presentes na amostra (NOLLET, 2006; LANÇAS, 2004).

A primeira etapa da EFS constitui-se no condicionamento do cartucho. Para o condicionamento é necessária a aplicação de um solvente orgânico adequado, que possibilite a ativação do material de empacotamento do cartucho. Nesta etapa é importante não deixar o material de preenchimento secar, pois caminhos preferenciais podem ser formados. Após esta primeira etapa, a amostra é eluída através do cartucho a um fluxo baixo e constante para que os analitos de interesse fiquem retidos no material adsorvente. Na etapa seguinte, de *clean up*, são removidos os possíveis interferentes que tenham sido retidos juntamente com os analitos de interesse, por meio da utilização de um solvente que elimine esses interferentes, mas mantenha os analitos. Por fim a eluição visa extrair os analitos de interesse que foram mantidos no cartucho. Nesta etapa, a escolha do solvente é fundamental para uma boa recuperação dos compostos (NOLLET, 2006). A Figura 5 mostra um esquema com as etapas da EFS mencionadas.

Figura 4 - Etapas da EFS



Fonte: NOLLET, 2006.

## 2.5.2. Técnicas analíticas cromatográficas

Dentre as técnicas cromatográficas disponíveis, a cromatografia gasosa (CG), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a eletroforese capilar (EC), vêm se destacando na química analítica pela capacidade de realizarem análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e em alimentos (RIBANI et al., 2004). A cromatografia gasosa é uma técnica com alto poder de resolução, capaz de separar e detectar dezenas de substâncias em uma mesma análise, podendo alcançar baixos limites de quantificação, o que a torna uma excelente técnica quantitativa (COLLINS et al., 2006).

O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade (VÉKEY, 2001). Embora o uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou de ultra eficiência (CLUE) acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM ou CLUE-EM) tenha se sobressaído nos últimos anos, a técnica de CG-EM é tida como uma das mais eficientes para a separação, identificação e quantificação de DE, mesmo na faixa de nanograma (MANSILHA et al., 2010; RICHARDSON, 2009; PETROVIC et al., 2002).

A espectrometria de massas é uma técnica de separação física que detecta e quantifica compostos de interesse através da criação de íons que serão separados e detectados de acordo com a relação massa-carga ( $m/z$ ). Este espectro permite a identificação da massa nominal do analito, além de prover características da fragmentação (impressão digital) o que viabiliza a sua identificação juntamente com o tempo de retenção apresentado pelo analito (SPARKMAN et al., 2011). Portanto, alta seletividade pode ser obtida, o que é de extrema importância em análise quantitativa em níveis traço (NIESSEN, 2001).

## **2.6. Métodos analíticos empregados na determinação do BPA**

Dentre os métodos verificados na literatura utilizados para determinar o BPA em águas, constatou-se que muitos trabalhos empregaram a CG-EM para detectar e quantificar o

BPA. Na etapa de eluição, os solventes metanol, acetato de etila, acetona e diclorometano são os mais utilizados. Observou-se que a CLAE também é muito utilizada, na qual o BPA pode ser detectado por ultravioleta (UV) e fluorescência (FLU). A Tabela 5 apresenta algumas metodologias empregadas na análise do BPA em amostras aquosas.

Tabela 6 - Metodologias empregadas na análise de BPA reportadas na literatura

Matriz	Método Cromatográfico	Cartucho	Eluente	LD	Rec (%)	Referência
Água superficial e tratada	HPLC/FLD	Poliestireno-divinilbenzeno (PSDVB)	Metanol	0,02 ng.mL <sup>-1</sup>	99,90%	LEANDRO, 2006
Águas superficiais	GC/MS	C <sub>18</sub>	Acetato de etila (1% de amônia)	1 µg.L <sup>-1</sup>	91,55%	BERALDO, 2002
Águas naturais e água potável	LC-MS (APCI)	LiChrolut RP-18	Metanol	2 e 15 ng.L <sup>-1</sup>	81%	RODRIGUEZ-MOZAZ et al., 2004
Águas de rio	GC/MS com derivatização	Cartuchos C <sub>18</sub> -E	acetato de etila	1,5 ng.L <sup>-1</sup>	100%	SELVARAJ et al., 2014
Águas de rio e água salgada	SIM-GC/MS derivatização com BSTFA	Oasis (melhor recuperação)	Acetato de etila mais eficiente	5,3 ng.L <sup>-1</sup>	Rio: 80,6 a 98% a Salgada: 95,1 a 96,2%	LIU et al., 2004
Água superficial	GC-MS com derivatização	C <sub>18</sub> ou LLE	Acetato de etila	5,0 ng.L <sup>-1</sup>	C <sub>18</sub> : 58 LLE: 117	MOL et al., 2000
Águas superficiais	GC/MS com derivatização	Oasis HLB	metanol-éter dietílico (10:90)	0,17 ng.L <sup>-1</sup>	74% (50 µg.L <sup>-1</sup> ) 82% (200 µg.L <sup>-1</sup> ) 78% (1000 µg.L <sup>-1</sup> )	JEANNOT et al., 2002

Fonte: O autor, 2016.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Área de estudo

O Rio Guandu, principal curso d'água da bacia da Baía de Sepetiba, é formado pelo Ribeirão das Lajes, que recebe as águas transpostas da bacia do Rio Paraíba do Sul. Estende-se por 48 km, da nascente até a foz, na Baía de Sepetiba. O seu maior afluente é o Rio Santana, que deságua no ponto a partir de onde o Ribeirão das Lajes passa a se chamar Rio Guandu. O seu curso final retificado leva o nome de Canal de São Francisco. Doze municípios fazem parte da bacia do Rio Guandu, são eles: Itaguaí, Seropédica, Queimados, Japeri, Paracambi, Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Engenheiro Paulo de Frontin, Miguel Pereira, Vassouras, Piraí e Rio Claro (Figura 5). O aspecto socioambiental de maior destaque nesta bacia é a utilização das águas do curso principal para abastecimento da Região Metropolitana do Rio de Janeiro (RMRJ) (ANA, 2007). Apesar da importância do manancial, esse rio é afetado, por graves problemas ambientais devido à poluição oriunda de seus afluentes, dos esgotos domésticos e industriais lançados, além de efluentes de práticas agropecuárias (SEMADS, 2001).

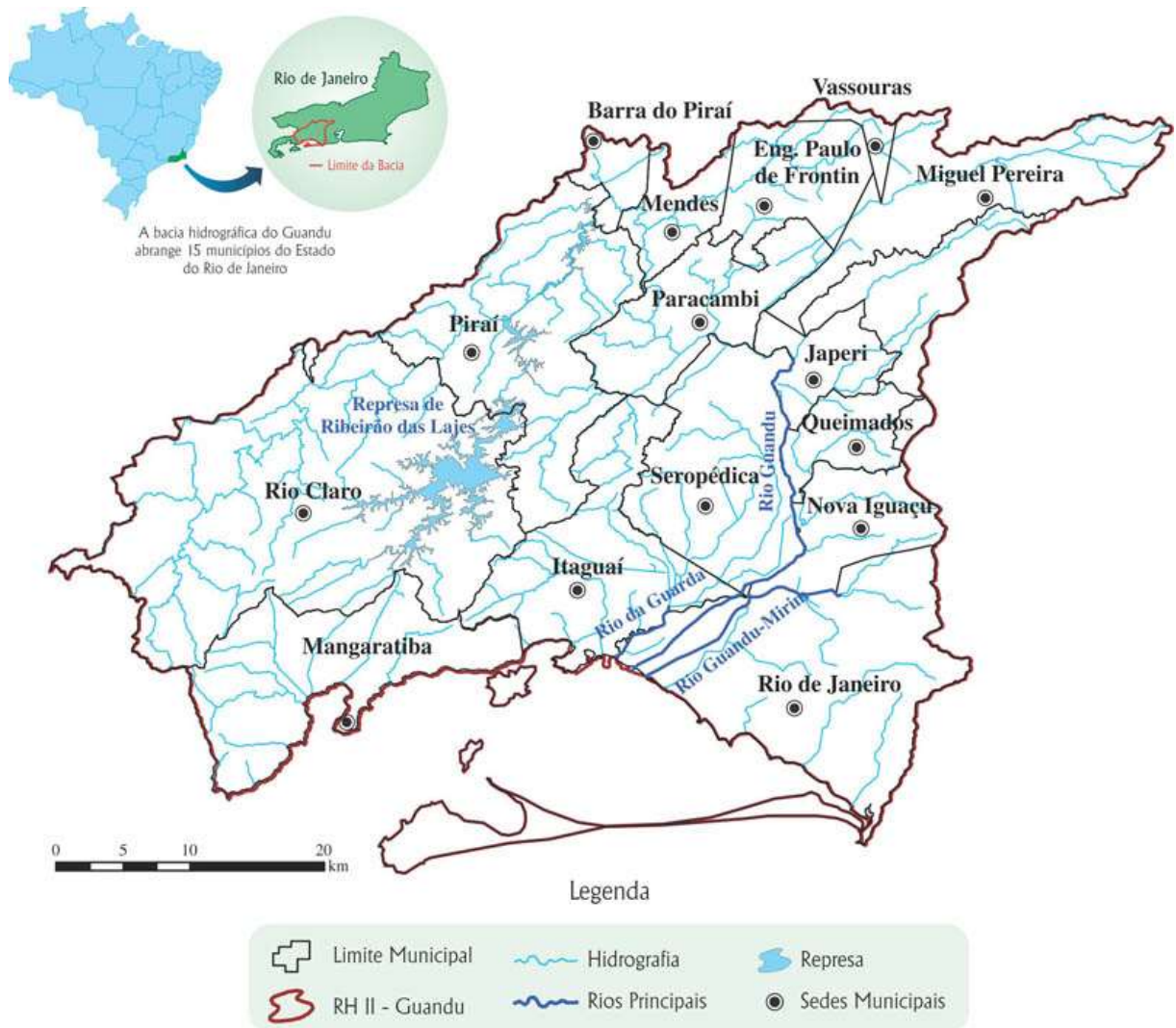
As coletas das amostras de água bruta foram realizadas em dois pontos do rio Guandu. O ponto 1 (Figura 6) localiza-se no município de Nova Iguaçu, a aproximadamente 150m antes da captação pela ETA e o ponto 2 (Figura 7) localiza-se no município de Japeri a aproximadamente 17.5 Km antes da captação pela ETA. Em relação ao ponto 3, referente a água potável, como não foi possível coletar a água exatamente na saída da ETA, foi realizada a coleta de água de uma torneira de um estabelecimento comercial situado próximo a ETA Guandu. Os pontos de coleta e sua localização podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7 - Pontos de coleta, município e as respectivas coordenadas geográficas

	<b>Município</b>	<b>Latitude</b>	<b>Longitude</b>
<b>Ponto 1</b>	Nova Iguaçu	22°50'18.14"S	43°36'31.37"O
<b>Ponto 2</b>	Japeri	22°39'25.37"S	43°39'51.13"O
<b>Ponto 3</b>	Nova Iguaçu	22°50'45.13"S	43°36'24.29"O



Figura 5 - Bacia hidrográfica do rio Guandu



Fonte: <http://www.comiteguandu.org.br/hidrografica.php>

Figura 6 - Ponto 1 de amostragem de água bruta do rio Guandu em Japeri



Figura 7 - Ponto 2 de amostragem de água bruta do rio Guandu em Nova Iguaçu



### 3.2. Reagentes e solventes

Os padrões Bisfenol A (99%) e 17 $\beta$ -estradiol (> 98%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. Os solventes etanol anidro, metanol, hexano e acetona, todos de grau HPLC/Spectro, foram adquiridos da Tedia® Brasil e o solvente diclorometano absolv também foi adquirido da Tedia® Brasil. A água ultrapura foi obtida através do sistema de purificação MilliQ-Millipore®. O ácido clorídrico P.A. foi obtido da Merck® e o extran neutro, usado para lavagem do material, foi obtido da Merck®.

Os reagentes utilizados no ensaio *in vitro* YES L-leucina, L-histidina, adenina, L-arginina-HCl, L-metionina, L-tirosina, L-iso-leucina, L-lisina-HCl, L-fenilalanina, L-ácido glutâmico, L-valina, L-serina, tiamina, piridoxina, pantetonato de cálcio, inositol, D-glucose, ácido aspártico, L-treonina, sulfato cúprico, sulfato de magnésio, pirofosfato de potássio, sulfato de amônio, sulfato férrico, hidróxido de potássio, biotina, CPRG (clorofenol vermelho- $\beta$ -D-galactopiranosida), todos de pureza  $\geq 98\%$ , foram obtidos da Sigma-Aldrich.

### 3.3. Limpeza e descontaminação de vidrarias

Por se estar analisando substâncias em concentrações traço, foi aplicada a metodologia específica de lavagem implementada no Laboratório de Engenharia Sanitária (LES) em todos os frascos de coleta, na vidraria e em todos os materiais utilizados durante o trabalho, com o objetivo de remover possíveis interferentes. O processo consistiu inicialmente na lavagem de vidrarias, frascos de coleta e aparatos relacionados ao manifold, como as conexões, canais e mangueiras com água da torneira, para depois serem deixados de molho em uma solução de detergente Extran à 5 % por um período de 24 hr. Após o período de molho foram enxaguadas por 10 vezes com água da torneira e depois enxaguadas com água mili-Q. Depois de enxaguadas iniciou-se a descontaminação com acetona, seguida pelo enxague com 5 vezes de água mili-Q, etanol e mais 3 vezes de água mili-Q. Foram utilizados frascos de vidro âmbar para armazenar os solventes e a água mili-Q, em vez dos tradicionais pissetes de plástico, com o intuito de evitar ao máximo o contato com materiais de plástico, e consequentemente a contaminação por BPA e plastificantes, como ftalatos e alquifenóis. As vidrarias não

volumétricas foram levadas a estufa a 60°C para completa secagem e a vidraria volumétrica foi depositada sobre bandejas forradas com papel alumínio para secagem em temperatura ambiente.

### 3.4. Coletas

As amostras referentes às análises cromatográficas e ao ensaio *in vitro* YES foram coletadas em frascos de vidro âmbar de 1L e as amostras referentes às análises dos parâmetros físico-químicos foram coletadas em frascos plásticos de 500 mL e acondicionadas em isopor com gelo. Após a chegada ao laboratório, foram adicionados 10 mL metanol em cada 1L de amostra coletada, com o objetivo de se evitar a degradação microbiológica dos compostos de interesse. Em seguida foram armazenadas na geladeira.

Entre os meses de março de 2015 a dezembro de 2016 foram realizadas seis coletas de água bruta e potável. Em cada coletada foram amostrados três pontos, sendo que para cada ponto foi coletada triplicata para as análises por cromatografia e duplicata para análises pelo ensaio *in vitro* YES (Tabela 8).

O índice pluviométrico registrado para cada coleta foi considerado como sendo a precipitação total ocorrida no período de um mês antes do dia de cada coleta. Os dados pluviométricos foram obtidos do Instituto Nacional de Meteorologia.

Tabela 8 - Quantidade de amostras coletadas ao longo das seis coletas realizadas. Coleta em triplicata para a as análises por cromatografia e duplicata para as análises pelo ensaio in vitro YES para cada um dos três pontos amostrados

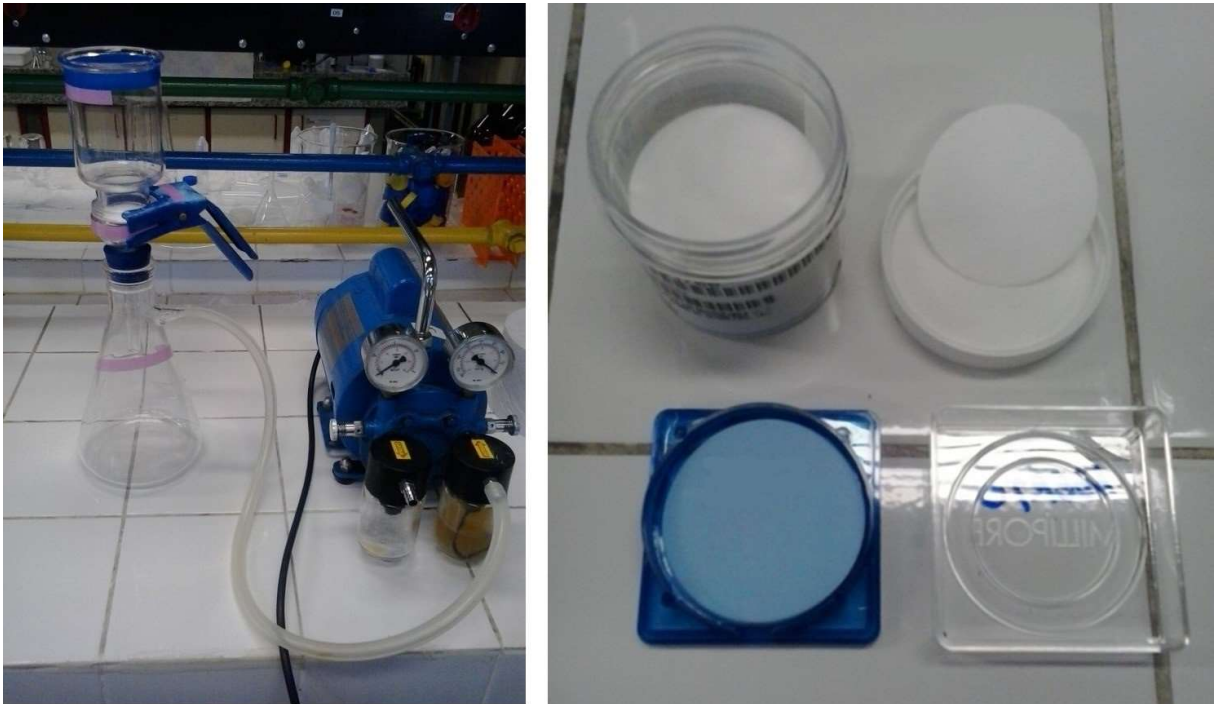
Coletas	CGEM-AR			YES			Total
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	
Março/15	3	3	-	2	2	-	10
Junho/15	3	3	3	2	2	2	15
Julho/15	3	3	3	2	2	2	15
Setembro/15	3	3	3	2	2	2	15
Novembro/15	3	3	3	2	2	2	15
Dezembro/15	3	3	3	2	2	2	15
Total	18	18	15	12	12	10	85

Fonte: O autor, 2016.

### 3.5. Filtração

Antes de iniciar-se o processo de filtração, as amostras foram retiradas da geladeira até que atingissem a temperatura ambiente ( $\pm 2$ h). Depois de atingida temperatura ambiente, as amostras foram filtradas em filtros de membranas de fibra de vidro de 1,2  $\mu$ m e de acetato de celulose de 0,45  $\mu$ m para a retirada dos sólidos em suspensão. Os aparatos de filtração estão apresentados na Figura 10. Antes de retornar a amostra filtrada para o frasco de vidro âmbar, tomou-se o cuidado de enxaguá-lo com água Mili Q. O pH das amostras foi ajustado para 2 com solução de ácido clorídrico (HCl) 3 mol/ L e verificado com tira indicadora universal de pH (Merck).

Figura 8 - Sistema de filtração à vácuo à esquerda e membranas usadas no processo de filtração à direita

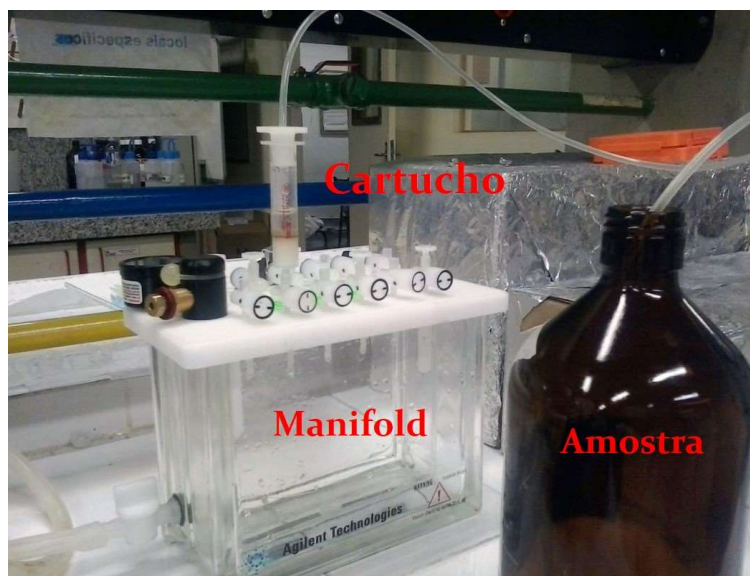


**Descrição:** Sistema de filtração à vácuo à esquerda (funil de vidro, base suporte em vidro esmerilhado, conexão para vácuo, grampo em alumínio e erlenmeyer (1000 mL) devidamente separados por cor das outras vidrarias de uso comum do laboratório. À direita estão as membranas usadas no processo de filtração.

### 3.6. Extração em Fase Sólida (EFS)

As condições de extração foram baseadas na metodologia utilizada por Lopes (2007). A primeira etapa consistiu no condicionamento dos cartuchos Strata-X (Phenomenex®) de 500 mg / 6 mL de fase reversa e sorvente de base polimérica. Os cartuchos foram condicionados percolando-se uma sequência de solventes, iniciada por 6 mL de n-hexano, seguida por 2 mL de acetona, 6 mL de etanol e por último 10 mL de água Mill-Q em pH 3 ajustado com solução de HCl 3M. Os solventes foram percolados com o auxílio da bomba à vácuo ao fluxo de aproximadamente  $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , mantendo sempre o gotejamento e tendo o cuidado de não deixar a fase sólida do cartucho secar entre um solvente e outro. Em seguida a amostra foi percolada pelo cartucho, tomando-se os mesmos cuidados da etapa de condicionamento. Cada 1L de amostra em cada frasco âmbar foi designado para 1 cartucho (Figura 9).

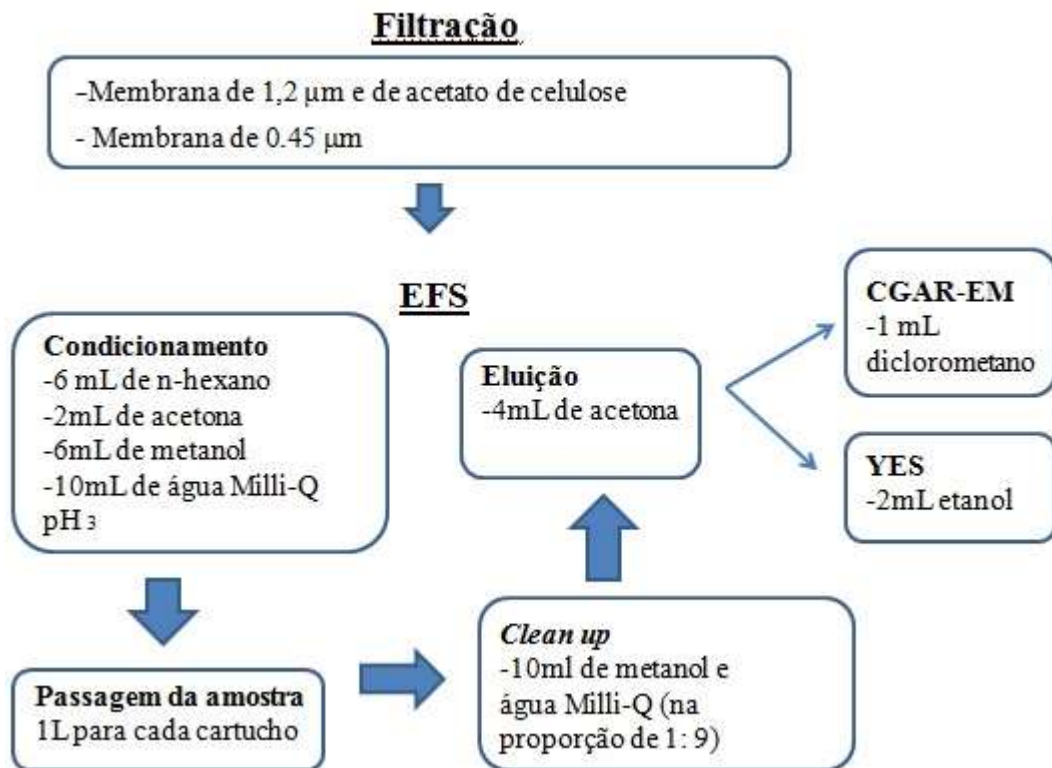
Figura 9 - Fotos dos aparatos da extração em fase sólida



Logo após a passagem da amostra foi realizado o *clean up* dos cartuchos, com o intuito de remover os interferentes, percolando uma solução de 10ml de metanol e água Milli-Q (na proporção de 1: 9). Em seguida os cartuchos foram secos no manifold por 10 minutos, com o auxílio da bomba à vácuo. Depois de secos os cartuchos foram então embalados em papel alumínio e armazenados em freezer (com temperatura de -20 °C).

Deu-se prosseguimento à metodologia com a etapa de eluição. Os analitos foram eluídos dos cartuchos com 4 mL de acetona sob efeito da gravidade e recolhidos em frascos com capacidade de 10 mL. Ao final do processo a bomba foi ligada por 5 minutos para completa secagem dos cartuchos. Em seguida o volume de solvente (eluato) recolhido no frasco foi submetido à secagem com o auxílio da bomba à vácuo. Após a secagem total da acetona, os analitos foram redissolvidos em 1mL de diclorometano para análise em cromatografia gasosa ou em 2 mL de etanol, para análise do ensaio YES. A Figura 10 mostra resumidamente o fluxograma das etapas da metodologia antecedentes as análises cromatográficas e do ensaio YES.

Figura 10 - Fluxograma resumido das etapas de filtração e EFS que antecedem as análises cromatográficas e do ensaio YES



### 3.7. Ensaio *in vitro* YES

O ensaio YES, (*Yeast Estrogen Screen*), é o ensaio *in vitro* pelo qual foi avaliada a atividade estrogênica das amostras de água bruta e potável pela metodologia desenvolvida por Routledge & Sumpter (1996) e adaptada por Bila (2005). O teste permite a identificação de substâncias químicas que são capazes de mimetizar a atividade do hormônio estrogênio e dessa forma causar desregulação endócrina.



### **3.7.1. Preparação das soluções utilizadas no ensaio**

Toda a vidraria utilizada foi de uso exclusivo do ensaio YES e foi descontaminada segundo metodologia citada no item 3.3, p. 42. Dessa forma evitou-se a possibilidade de interferentes e contaminações.

Para o preparo das soluções, os reagentes foram pesados em Becker de 50 mL destinados somente para este fim e após a esterilização as soluções somente foram abertas em capela de fluxo laminar.

O preparo das soluções (Meio Mínimo, Glicose, Ácido L-aspártico, L-treonina, Sulfato de Cobre, Vitamina, CPRG e Meio de Cultivo) encontra-se disponível no ANEXO I.

As soluções utilizadas no ensaio foram armazenadas em frascos de vidro e autoclavadas a 121°C por 15 minutos e estocadas a temperatura ambiente, com exceção da solução de vitamina e de CPRG, que foi armazenada em geladeira.

### **3.7.2. Cepa da levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) Recombinante**

A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada no ensaio YES do presente trabalho foi obtida por doação da Prof. Márcia Dezotti do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ. O cultivo e preparo da cepa foi realizado segundo a metodologia desenvolvida por ROUTLEDE e SUMPTER (1996).

### **3.7.3. Preparo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Recombinante**

#### **3.7.3.1. Descongelamento e Pré inóculo**

As etapas de descongelamento e pré-inóculo foram realizadas 48 horas antes do ensaio. A levedura foi descongelada deixando-se o conteúdo do tubo criogênico em capela de fluxo laminar em torno de 15 minutos. Em um frasco T estéril de 50 mL foram adicionados

10 mL do meio de cultivo e em seguida o conteúdo do tubo, já descongelado. Os frascos de cultivo foram incubados a 28 °C por 24 horas sob agitação de 150 rpm, em incubadora de bancada com agitação orbital (Marca Quimis, modelo Q816M20).

### **3.7.3.2. Inóculo**

O inóculo foi realizado 24 horas antes do ensaio, adicionando-se 10 mL do meio de cultivo à um novo frasco T estéril e em seguida 100 µL do pré-inóculo do dia anterior, sendo incubado novamente sob as mesmas condições do pré-inóculo.

### **3.7.3.3. Congelamento**

O congelamento foi sempre realizado ao término de cada ensaio com as células que restantes do inóculo utilizado, para garantir que a levedura fosse congelada fresca. Em tubo criogênico estéril, volume de 2 mL, foi colocada a levedura e adicionado o glicerol previamente esterilizado a 121°C por 15 minutos, na proporção de 40% (900 µL de células em meio de cultivo e 600 µL de glicerol estéril). Os tubos criogênicos foram armazenados em freezer a temperatura de - 20 °C, onde podem ser mantidos por até 1 ano e também a temperatura de -80 °C, podendo ser guardados por mais tempo, no prazo máximo de 5 anos.

### **3.7.4. Preparação do meio de análise**

O meio de análise foi preparado utilizando-se 25 mL de meio de cultivo, 250 µL da solução de CPRG (10mg/mL) e 25 µL da solução do tubo falcon que contém a levedura. Esse protocolo é suficiente para o ensaio com duas amostras.

### 3.7.5. Preparação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*) no dia ensaio

A levedura foi preparada em um tubo falcon (com capacidade de 50 mL) estéril misturando-se 4 mL do meio de cultivo com uma quantidade em torno de 2 mL do conteúdo do inóculo do dia anterior. Uma alíquota dessa solução foi retirada e lida na absorbância de 620 nm. A faixa de 0,8 a 1,0 significa que a faixa está boa e a cultura pronta para o uso). Caso a absorvância ultrapasse o valor de 1,0 é preciso adicionar um pouco mais de meio de cultivo à solução, por outro lado, se a absorbância estiver abaixo de 0,8, será necessário adicionar um pouco mais do conteúdo do frasco T. A alíquota foi descartada depois da verificação, pois o procedimento é inteiramente realizado em capela de fluxo laminar. Uma vez retirada da capela para a leitura de sua absorbância, a levedura não pode mais ser utilizada no ensaio.

### 3.7.6. Procedimento do ensaio *in vitro* YES

As amostras ambientais eluídas provenientes da EFS e o padrão BPA foram analisados quanto à atividade estrogênica. Para cada batelada de ensaio uma curva padrão do controle positivo 17 $\beta$ -estradiol foi plotada como referência. Para isso utilizou-se uma solução estoque na concentração de 54,48  $\mu\text{g.L}^{-1}$  preparada a partir do padrão 17 $\beta$ -estradiol em etanol, seguindo o mesmo procedimento das amostras ambientais e do BPA.

O ensaio foi realizado em uma placa estéril de 96 poços em capela de fluxo laminar. As fileiras A e C; E e G correspondem às amostras em duplicata, enquanto que as fileiras B e D, F e H correspondem às fileiras do branco (controle negativo). O procedimento requer duas placas, sendo uma de diluição e a outra de análise, onde nesta última ocorrerá o ensaio efetivamente (Figura 11, pág). Inicialmente foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de etanol em todos os poços dos brancos (controle negativo) das placas de análise. A etapa de diluição iniciou-se com a adição de 200  $\mu\text{L}$  da amostra no primeiro poço da primeira fileira da placa de diluição. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta multicanais (12 canais), foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de etanol nos onze poços restantes da primeira fileira. A partir daí foi iniciada a diluição seriada da amostra do 17  $\beta$ -estradiol ou do BPA. O 17 $\beta$ -estradiol é considerado um padrão dos ensaios de atividade estrogênica, sendo assim, é usado como controle positivo no ensaio

YES para demonstrar a resposta estrogênica. Foram transferidos 100  $\mu$ L da amostra do primeiro poço para o segundo, homogeneizando pelo menos cinco vezes com o auxílio da micropipeta, ao retirar o conteúdo e devolvê-lo para o poço. Esse processo foi feito do segundo poço ao terceiro sucessivamente até o 12<sup>o</sup> da primeira fileira. Ao final, com o auxílio da pipeta multicanais, foram então pipetados e transferidos 10  $\mu$ L do conteúdo dos doze poços da primeira fileira da placa de diluição para os doze poços primeiramente da fileira A e seguidamente da fileira C. Como o ensaio ocorre em duplicata, as fileiras A e C correspondem a uma determinada amostra e as fileiras E e G a outra. Após realizada a primeira etapa, as placas de análise foram abertas com o intuito de evaporar todo o etanol presente. Depois de evaporado, foram então adicionados 200  $\mu$ L do meio de análise, primeiramente nas fileiras dos brancos e posteriormente nas fileiras onde estão presentes as amostras (Figura 12).

Figura 11 - Demonstração de etapas da execução do ensaio in vitro YES nas placas de diluição e de análise

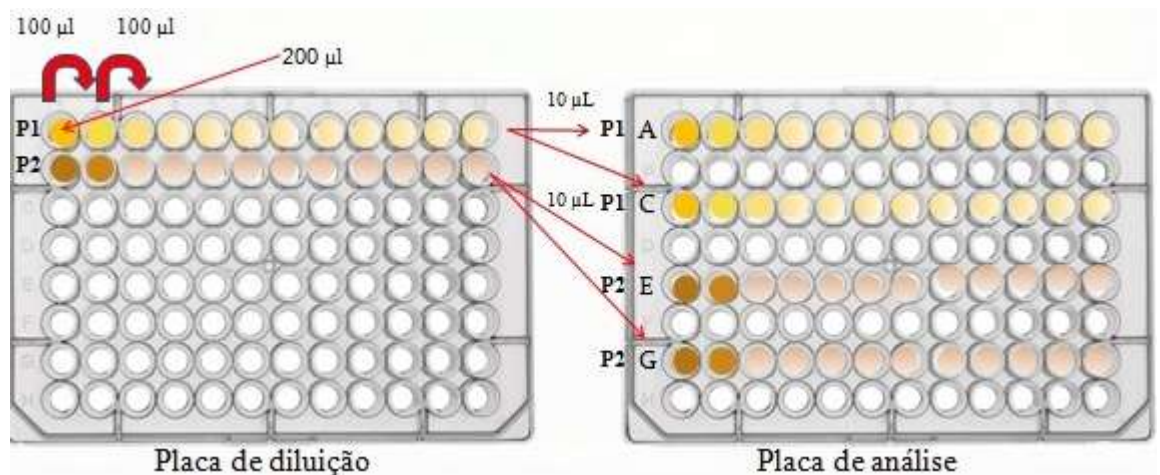


Figura 12 - Placa de reação do ensaio *in vitro* YES no início do período de incubação das 72h



As placas foram fechadas com fita adesiva e levadas ao agitador (Marca IKA, modelo MS-3), onde foram homogeneizadas por dois minutos e então transferidas para a estufa na qual permaneceram por 72 horas a 30°C. Ao final das 72 horas, já é possível observar a mudança de coloração nos poços que passam de amarelo a tons de rosa, quando há atividade estrogênica. Quando retiradas da estufa, as placas foram levadas ao espectrofotômetro (Marca Softmax, modelo SpectraMax M3) e as placas foram lidas nos comprimentos de onda de 575 nm para cor e 620 nm para turbidez). Silva (2015) constatou através da leitura em varredura da maior concentração do controle positivo, uma melhor absorção no comprimento de onda 575 nm.

Ao todo foram realizados seis ensaios *in vitro* YES, correspondentes as 6 coletas amostradas. Para cada bateria de ensaio foi realizado um controle positivo (17 $\beta$ -estradiol), totalizando seis controles positivos. Foi plotada uma curva do perfil do controle positivo 17 $\beta$ -estradiol ao longo dos seis ensaios.

Após a leitura, seguindo o protocolo de biossegurança, as placas e todo material que esteve em contato com a *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada foram autoclavados antes do descarte a 121°C por 15 minutos, a fim de inativar a levedura que esteve em contato com o material. Ainda que este OGM - organismo geneticamente modificado seja pertencente à classe de risco 1 (baixo risco individual e baixo risco para a comunidade - organismo que não causa doença ao homem ou animal), esses protocolos para OGM são sempre obrigatórios.

### 3.7.7. Análise dos Dados

#### 3.7.7.1. Avaliação do limite de detecção (LD)

Com base na curva dose-resposta do controle positivo 17 $\beta$ -estradiol, o limite de detecção para cada ensaio pode ser calculado. A atividade estrogênica superior a 10% do valor do branco foi avaliada como positiva.

#### 3.7.7.2 .Análise dos resultados do ensaio YES

Com os valores obtidos das leituras das absorvâncias de 575 e 620 nm seguiu-se a construção dos gráficos com as curvas dose-resposta do ensaio. A mudança de cor do ensaio é avaliada na absorvância de 575, o que vai indicar a atividade estrogênica da amostra, enquanto que a absorvância de 620 mede a turbidez do poço ocasionada pelo crescimento da levedura. Assim, para corrigir a resposta estrogênica de cada poço de amostra ocasionada pela turbidez, prosseguiu-se com a aplicação da fórmula contida na equação 1:

#### Equação 1:

$$Abs_{\text{corrigida Amostra}} = Abs_{575\text{Amostra}} - (Abs_{620\text{ Amostra}} - Abs_{620\text{ Branco}}).$$

A correção foi feita para cada poço da placa, utilizando os valores de absorvâncias obtidos nos dois comprimentos de onda para cada concentração na curva. Para calcular esta correção, utilizou-se a média dos valores das absorvâncias das duas fileiras de brancos correspondentes às amostras (linhas B e D ou F e H), resultando na média de 24 amostras de branco. Assim, os dados apresentados correspondem à média das absorvâncias das amostras analisadas em duplicata.

A curva dose-resposta do controle positivo 17 $\beta$ -estradiol foi construída relacionando-se os valores de absorbância corrigida em função da concentração, sendo expresso em ng.L<sup>-1</sup>, em escala logarítmica. Enquanto que as curvas dos extratos das amostras foram expressas em percentual, sendo construídas da mesma maneira da curva dose-resposta do controle positivo 17 $\beta$ -estradiol.

Os valores de CE<sub>50</sub> do 17 $\beta$ -estradiol foram determinados a partir de sua curva dose-resposta. O valor de CE<sub>50</sub> corresponde à concentração que elucida 50% da maior resposta obtida da  $\beta$ -galactosidase no ensaio YES, em relação à curva padrão. Para o 17 $\beta$ -estradiol o CE<sub>50</sub> foi expresso em ng.L<sup>-1</sup>.

Para as substâncias padrões também foi calculado o CE<sub>50</sub> a partir de sua curva padrão, também sendo expresso em ng.L<sup>-1</sup>. Para o cálculo do CE<sub>50</sub> usou-se o programa Origin® 6.0

Para as amostras, calculou-se o equivalente estradiol (EQ-E<sub>2</sub>) da máxima indução da  $\beta$ -galactosidase, através da interpolação dos dados da curva da amostra com os da curva do controle positivo 17 $\beta$ -estradiol. Para esse cálculo utilizou-se a Equação 2, onde:  $y$  é o valor de Abs<sub>corrigida</sub> da amostra,  $x$  é a concentração da substância estrogênica no ensaio, ou seja, o EQ-E<sub>2</sub> da amostra.  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $x_0$  e  $p$  são dados relativos à curva do controle positivo 17 $\beta$ -estradiol, onde:  $A_1$  é a máxima indução da  $\beta$ -galactosidase,  $A_2$  é a mínima indução da  $\beta$ -galactosidase,  $x_0$  é o valor de CE<sub>50</sub>,  $p$  é a inclinação da região mediana da curva como estimado de uma regressão linear/log da parte linear da curva dose-resposta.

### **Equação 2:**

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

Após a aplicação da fórmula, o valor foi dividido pelo fator de concentração utilizado na EFS para se chegar ao valor real de EQ-E<sub>2</sub> da amostra.

Para se determinar o potencial estrogênico do BPA foi realizada uma comparação com o controle positivo de referência, 17 $\beta$ -estradiol, determinando a potência relativa estrogênica (PR), calculada a partir da Equação 3:

**Equação 3:**

$$PR = \frac{EC_{50}(17\beta\text{-estradiol})}{EC_{50}(\text{amostra})}$$

Admitiu-se que o controle positivo 17 $\beta$ -estradiol possui potência relativa 1, e partindo desse princípio, quando o valor da PR é maior que 1, significa que a substância padrão analisada possui maior estrogenicidade em relação ao controle positivo (17 $\beta$ -estradiol). Quando a PR é menor que 1, significa que a amostra possui menor potencial estrogênico em relação ao controle positivo.

Se a amostra apresentou resposta estrogênica positiva formando uma curva sigmoidal, calcula-se o CE<sub>50</sub> e a PR se for substância padrão, se for amostra ambiental calcula-se o EQ-E<sub>2</sub>. Caso a amostra não apresente curva dose-resposta sigmoidal, mas apresente uma resposta maior que o critério de negatividade (10% do branco), se for amostra ambiental é possível calcular o EQ-E<sub>2</sub>, porém se for uma substância padrão é preciso prepará-la mais concentrada para atingir a curva sigmoidal e assim calcular o CE<sub>50</sub> e a PR.

A atividade estrogênica total das amostras ambientais foi medida comparando-se com a atividade estrogênica do E<sub>2</sub> (composto de maior potencial estrogênico), sendo expressa como equivalentes de estradiol (EQ-E<sub>2</sub>). Para detectar os valores de EQ-E<sub>2</sub> relativos ao BPA nas amostras de água e com isso estimar a contribuição do BPA para a atividade estrogênica total detectada pelo ensaio *in vitro* YES, foi utilizada a Equação 4 (CÉSPEDES et al., 2004; ESTEBAN et al., 2014).

**Equação 4:**

$$EQ\text{-}E_2 \text{ (ng.L}^{-1}\text{)} = C_i \times PR_{BPA}$$

Na qual EQ-E<sub>2</sub> é a atividade estrogênica do BPA em água; C<sub>i</sub> é a concentração de BPA determinada pela análise cromatográfica e PR é a potência relativa (PR) do BPA determinada no presente trabalho.



### 3.8. Análises cromatográficas

#### 3.8.1. Otimização do método cromatográfico

A identificação e quantificação do BPA foram realizadas por cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas no modo monitoramento seletivo de íons (CGAR-EM-MSI). Para isto, foi utilizado um cromatógrafo gasoso (GC-456, Bruker Daltonics Inc.) acoplado a um espectrômetro de massas (Scion TQ-MS, Bruker Daltonics Inc.). Inicialmente o padrão BPA foi injetado para obtenção do tempo de retenção e para avaliação da sensibilidade do detector. Os parâmetros cromatográficos (fluxo do gás de arraste, programação do forno, temperaturas do injetor, interface, e voltagem do detector) foram testados e ajustados de forma a se chegar nas melhores condições. A seleção dos íons monitorados foi realizada com base na literatura e nos próprios espectros de massas (Tabela 9).

Tabela 9 - Condições cromatográficas utilizadas na técnica no sistema CGAR-EM

<b>Coluna</b>	BR-5MS (30m x 0.25mm x 0,25µm) de fase 95% polisiloxano e 5%fenil
<b>Modo de Injeção</b>	Splitless
<b>Temperatura do Injetor</b>	280 °C
<b>Gás de arraste</b>	Hélio
<b>Fluxo</b>	1,2 ml/min
<b>Volume injetado</b>	2,0 µL
<b>Temperatura do forno</b>	→ 100°C (0.60 min) / 200 °C à 15 °C / min → 275 °C à 3 °C / min (durante 5 min) → 300 °C à 15 °C / min (durante 10 min)
<b>Temperatura da fonte de ionização</b>	230 °C , 70 eV
<b>Temperatura da linha de transferência</b>	250 °C
<b>Íons monitorados (m/z)</b>	BPA ( 213e 228 Da)
<b>Tempo de retenção</b>	<u>13,5 min</u>
<b>Tempo de análise</b>	<u>52,93 min</u>

### **3.8.2. Construção da curva analítica**

Foram preparadas soluções estoque de 1000 mg.L<sup>-1</sup> e 500 µg.L<sup>-1</sup> de BPA em diclorometano. A partir das soluções mãe foi construída uma curva analítica com seis concentrações diferentes de BPA, variando de 1 µg.L<sup>-1</sup> a 100 µg.L<sup>-1</sup>, que foi injetada anteriormente a cada conjunto de amostras a serem analisadas.

### **3.8.3. Determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) e linearidade do método.**

Com o objetivo de otimizar o método cromatográfico, foram determinados para o presente trabalho os seguintes parâmetros: linearidade, LD e LQ. A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em estudo, dentro de uma determinada faixa de aplicação. O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em estudo que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, enquanto que o LQ representa a menor concentração da substância que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (INMETRO, 2003).

O LD, LQ e a linearidade do método desenvolvido para o BPA foram calculados utilizando a planilha de validação criada e reportada por Ribeiro & Ferreira (2008). Para isto, foram utilizados os valores de concentração real dos pontos da curva analítica e as respectivas intensidades obtidas como resposta no espectrômetro de massas. A linearidade foi determinada através do coeficiente de correlação (r) e o LD e o LQ foram expressos em níveis de confiança de 95, 99 e 99,9%.

### **3.9. Parâmetros físico-químicos**

Todas as amostras de água foram caracterizadas com base nos seguintes parâmetros físico-químicos: pH, condutividade, turbidez, cor, nitrogênio amoniacal, fósforo total, COD

(carbono orgânico dissolvido), sólidos dissolvidos e suspensos totais e DQO (demanda química de oxigênio), seguindo as metodologias descritas em (APHA, 2012) de acordo com os métodos específicos para cada parâmetro (Tabela 10).

Tabela 10 - Parâmetros físico-químicos e suas respectivas metodologias descritas em APHA (2012)

<b>Parâmetro</b>	<b>Método</b>	<b>Equipamento</b>
<b>pH</b>	pHmetro	4500 - H <sup>+</sup> B
<b>Condutividade</b>	Condutivímetro	2510 B
<b>Série sólidos</b>	Bomba de vácuo, estufa, mufla, balança analítica e kit de filtração	2540 B, 2540 C, 2540 D, 2540 E, 2540 F, 2540 G
<b>DQO</b>	Digestor de DQO e espectrofotômetro	5220 D
<b>Fósforo total</b>	Placa de aquecimento, espectrofotômetro	4500 - P E
<b>Turbidez</b>	Turbidímetro	2130 B
<b>COD</b>	TOC – V CPN Shimadzu, kit de filtração e bomba de vácuo	5310 B
<b>Cor</b>	Espectrofotômetro, kit de filtração e bomba de vácuo	2120 D
<b>Nitrogênio Amoniacal</b>	Eletrodo Íon-seletivo de amônia	4500 - NH <sub>3</sub> D

Fonte: APHA, 2012.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Ensaio *in vitro* YES

O resultado do ensaio *in vitro* YES foi obtido após 72h. Caso haja atividade estrogênica, será observada uma mudança de coloração ocasionada pela degradação do substrato cromogênico (CPRG), que é amarelo em CPR, que é rosa. Essa ação é caracterizada pelo potencial estrogênico das substâncias presentes na amostra, que tem a capacidade de se

ligar ao Reh presente na levedura, ocasionando a metabolização do substrato cromogênico pela enzima  $\beta$ -galactosidase, o que proporcionando a mudança de coloração observada na Figura 13.

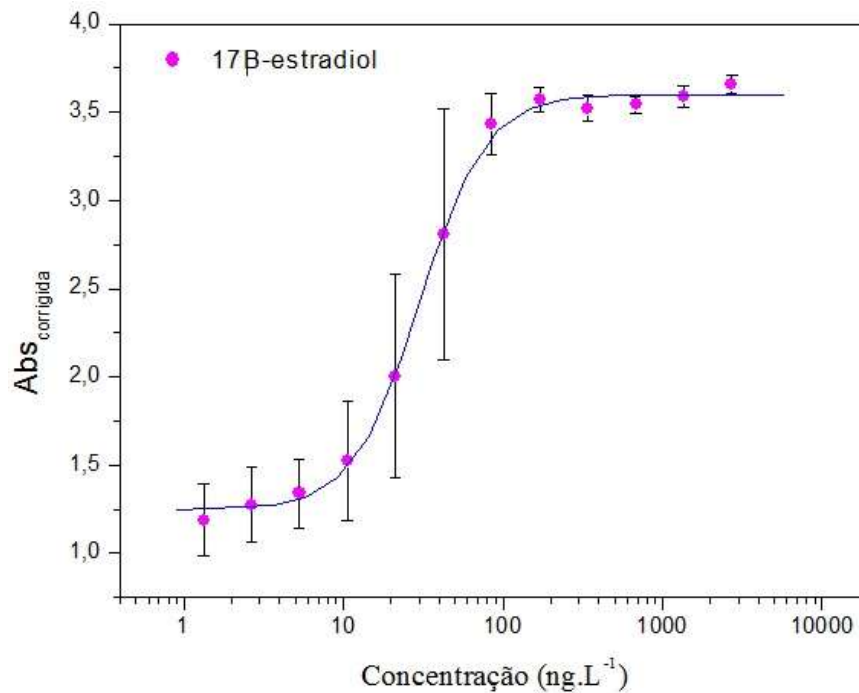
Figura 13 - Foto da placa de 96 poços ao final das 72h no ensaio *in vitro* YES



#### 4.1.1. Controle positivo 17 $\beta$ -estradiol

Para cada bateria de amostras analisadas pelo ensaio *in vitro* YES, foi realizado um ensaio com o controle positivo 17 $\beta$ -estradiol, sendo produzida uma curva dose resposta e seu respectivo valor de CE<sub>50</sub> na faixa de concentrações de 2724 a 1,3301 ng.L<sup>-1</sup> (Figura 14). Ao todo foram realizados seis ensaios e, portanto, foram produzidas seis curvas dose-resposta. O limite de detecção do ensaio foi de 10,13  $\pm$  3,65 ng.L<sup>-1</sup> e a média do CE<sub>50</sub> para os seis ensaios foi de 32,63  $\pm$  15,94 ng.L<sup>-1</sup>, o que se aproxima do resultado encontrado por Balsiger et al., (2010), de CE<sub>50</sub> 39,5 ng.L<sup>-1</sup> para o 17 $\beta$ -estradiol. Outros trabalhos que realizaram o ensaio *in vitro* YES com diferentes cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, encontraram valores um pouco maiores do CE<sub>50</sub>, porém relativamente próximos, como 49 ng.L<sup>-1</sup>, (BECK et al., 2006); 54,5 ng.L<sup>-1</sup> (FIC et al., 2014) e 57,2 ng.L<sup>-1</sup> (RUTISHAUSER et al., 2004).

Figura 14 - Curva dose-resposta do controle positivo 17 $\beta$ -estradiol na faixa de concentração de 2724 a 1,3301 ng.L<sup>-1</sup> obtida em um dos ensaios *in vitro* YES realizados ao longo do estudo

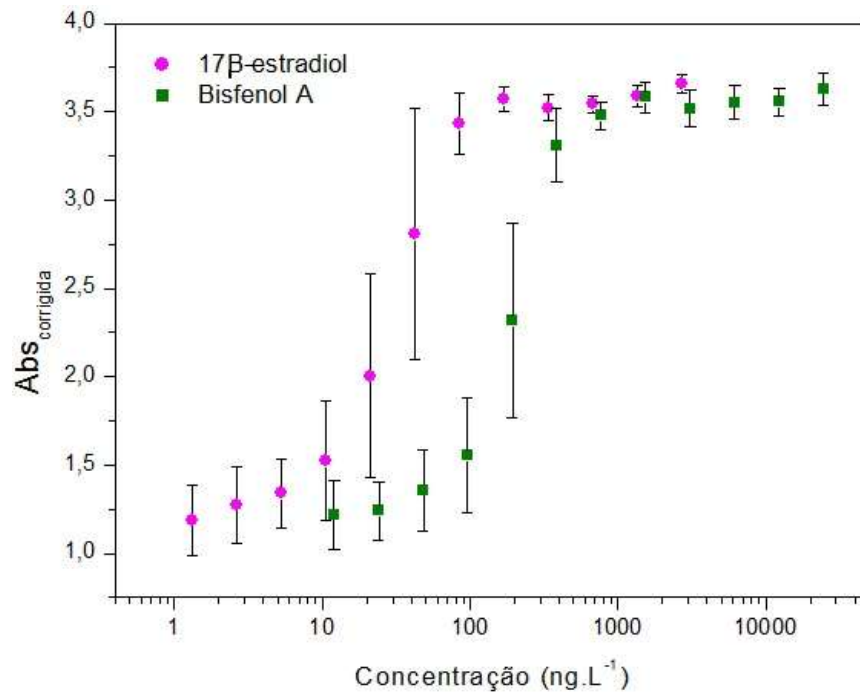


Fonte: O autor, 2016.

#### 4.1.2. Atividade estrogênica do composto BPA pelo ensaio *in vitro* YES

Para a determinação da curva dose-resposta do composto BPA no ensaio YES, utilizou-se a faixa de concentração de 24750  $\mu\text{g.L}^{-1}$  a 12,08  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Figura 15). Foram realizados cinco ensaios com o padrão BPA, com a média dos valores de  $\text{CE}_{50}$   $165,26 \pm 96,11$   $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Comparando as curvas do BPA e do  $\text{E}_2$  e os valores do  $\text{CE}_{50}$ , observa-se que o BPA é menos estrogênico que o  $\text{E}_2$ .

Figura 15 - Curva dose-resposta do composto BPA no ensaio YES na faixa de concentração de 24750  $\mu\text{g.L}^{-1}$  a 12,08  $\mu\text{g.L}^{-1}$



Fonte: O autor, 2016.

O potencial estrogênico do BPA foi determinado pelo cálculo de sua potência relativa (PR) em relação ao  $\text{E}_2$ , utilizando a Equação 3 (item 3.7.7.2, p. 55). O  $\text{E}_2$  representa a substância de maior potencial estrogênico e por isso considera-se o valor de 1 para sua PR. Portanto, quanto mais próximo de 1 (valor máximo) for o valor da PR da substância, maior será o seu potencial estrogênico. O valor da PR encontrada para o BPA foi  $1,9 \times 10^{-4}$ , evidenciando que o composto apresenta estrogenicidade, porém é menos estrogênico do que o  $\text{E}_2$ . De uma forma geral, a PR do BPA determinada no presente trabalho foi maior que a PR encontrada por outros autores que também utilizaram cepas de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante e receptor de estrogênio como via de sinalização (Tabela 5, p. 32).

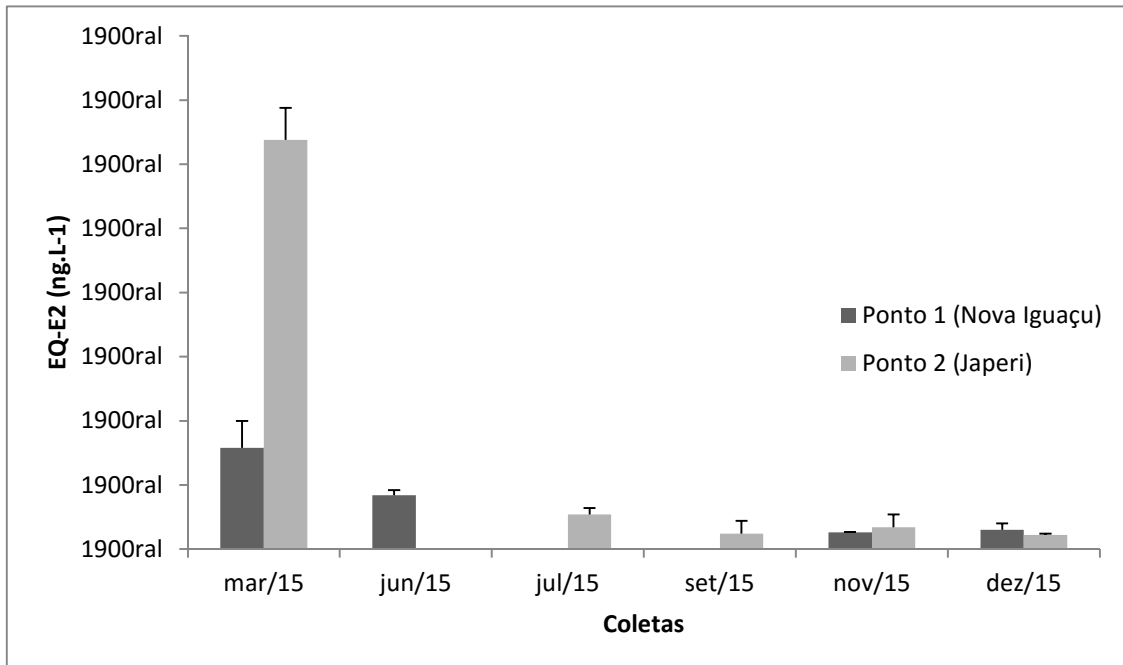
Os diferentes valores da PR encontrados na literatura, podem ser devido à metodologia adotada em cada trabalho. Diferentes variáveis podem influenciar no desenvolvimento do ensaio YES como, por exemplo, o tempo de incubação da levedura na placa de ensaio, o uso e a manipulação de diferentes solventes e reagentes e o número inicial de células (SILVA, 2015). Sendo assim, a PR de cada padrão pode variar de acordo com o analista, o laboratório e os materiais utilizados, mas os valores devem ser o mais próximo possível para a confiabilidade do ensaio.

#### 4.1.3. Determinação da atividade estrogênica das amostras de água bruta e potável.

O tratamento ineficiente ou inexistente dos efluentes domésticos e industriais permite que os DE cheguem ao ambiente aquático através da descarga destas águas residuais, o que contribui para a ocorrência de atividade estrogênica por parte dessas matrizes.

Verificou-se que das doze amostragens de água bruta realizadas nos pontos 1 e 2 ao longo das seis coletas, nove apresentaram atividade estrogênica, em uma faixa de EQ-E<sub>2</sub> que variou de 1,2 a 8 ng.L<sup>-1</sup> no ponto 1, e de 1,0 a 32 ng.L<sup>-1</sup> no ponto 2. No entanto, nenhuma das amostras de água potável (ponto 3) apresentou atividade estrogênica. A Figura 16 apresenta o gráfico com os valores de EQ-E<sub>2</sub> das amostras coletadas no rio Guandu nos pontos 1 e 2 no período de março a dezembro de 2015 no ensaio *in vitro* YES. As curvas dose-resposta obtidas com os ensaios das amostras estão disponíveis no ANEXO III.

Figura 16 - Valores de EQ-E<sub>2</sub> das amostras de água bruta do rio Guandu coletadas no período de março a dezembro de 2015



Fonte: O autor, 2016.

Para o rio Guandu já foi detectada a presença de DE e/ou de atividade estrogênica por alguns autores como Dias et al. (2015); Kuster et al. (2009); Silva (2015); Licurgo (2016). Dias et al. (2015), que também verificou atividade estrogênica de amostras de águas de dois pontos do rio Guandu, encontrou concentração máxima de EQ-E<sub>2</sub> de 1,3 ng.L<sup>-1</sup> e 0,5 ng.L<sup>-1</sup> nos dois pontos amostrados, ou seja, valores menores do que encontrados no presente trabalho, que foi de 32 ng.L<sup>-1</sup> para o ponto 2. Segundo López-Roldán et al., (2010), a concentração de 1 ng L<sup>-1</sup> de EQ-E<sub>2</sub> já é suficiente para causar efeitos estrogênicos em organismos aquáticos, o que é preocupante, visto que as concentrações detectadas no presente trabalho excederam essa concentração nos dois pontos amostrados.

A presença de hormônios esteróides como fitoestrogênios, estrogênios e progestogênios no rio Guandu foi previamente detectada por Kuster et al. (2009). Foram detectados o estriol, e os derivados conjugados estradiol-17-glucoronídeo e estriol-16-glucoronídeo, além de níveis consideráveis de progesterona. A progesterona, possivelmente devido à sua estrutura química, apresentou estrogenicidade que foi previamente detectada pelo ensaio YES por Wang et al. (2005), em contraste com os derivados conjugados que não apresentam resposta. No entanto, estes glucoronídeos são facilmente convertidos em estriol e estradiol por enzimas produzidas por bactérias encontradas no esgoto e nas águas (KUSTER et al., 2009). Dessa forma, entende-se que estas substâncias podem também ser responsáveis pela significativa atividade estrogênica detectada nas amostras de água do presente estudo.

Silva (2015) detectou e quantificou o composto 17 $\alpha$ -etinilestradiol por CLAE em 95% das amostras de água bruta do rio Guandu, além de detectar atividade estrogênica em todas as amostras de água bruta na faixa de concentração de 0,015 a 3,37 ng.L<sup>-1</sup>, sendo o valor máximo de 3,37 ng.L<sup>-1</sup> maior que o do presente trabalho, que foi de 32 ng.L<sup>-1</sup>. Além disso, das dez amostras de água potável, cinco apresentaram atividade estrogênica, tendo a concentração máxima de EQ-E<sub>2</sub> igual a 0,6 ng.L<sup>-1</sup>, em contraste com o presente trabalho, no qual nenhuma das amostras de água potável apresentou atividade estrogênica. Assim, pode-se dizer que o 17 $\alpha$ -etinilestradiol, um dos compostos já encontrados no rio Guandu, pode ser um micropoluente que contribui para a atividade estrogênica total detectada.

Licurgo (2016) determinou, para o rio Guandu, ftalatos e alquifenóis em água potável e em concentrações ambientalmente relevantes, excedendo 1000 ng.L<sup>-1</sup> em água bruta. A estrogenicidade de alguns compostos destes grupos também foi detectada e confirmada.



Em matrizes ambientais estão presentes uma diversidade de DE. Como verificado pelos trabalhos de Dias et al. (2015), Kuster et al. (2009), Silva (2015), e Licurgo (2016), os compostos já detectados para o rio Guandu apresentam atividade estrogênica e por isso, podem estar contribuindo, da mesma forma que o BPA, para a atividade estrogênica total detectada pelo ensaio *in vitro* YES no presente trabalho. Mesmo que não tenha sido detectada atividade estrogênica para as amostras de água potável provenientes do rio Guandu, foram encontradas concentrações relevantes de BPA, flatatos, alquifenóis, 17 $\alpha$ -etinilestradiol, o que não deixa de ser preocupante, visto que essa água é utilizada para abastecimento público.

#### 4.1.4. Comparação com outros trabalhos da literatura

A Tabela 4, p. 32, lista alguns valores de EQ-E<sub>2</sub> de águas superficiais em diferentes locais no mundo. Mesmo que as águas superficiais nestas regiões sejam distintas, por apresentarem diferentes usos, níveis de tratamento e abrangência no atendimento a populações (conglomerados ou cidades pequenas), é importante observar as concentrações de EQ-E<sub>2</sub> em águas superficiais em outras regiões ao redor do mundo.

O maior valor de EQ-E<sub>2</sub> detectado no presente trabalho para água bruta do rio Guandu foi de 32 ng.L<sup>-1</sup> (Ponto 2), o qual corresponde a concentrações de EQ-E<sub>2</sub> detectadas em efluentes. Pawlowski et al. (2004) detectaram EQ-E<sub>2</sub> de 34,1 ng.L<sup>-1</sup> em efluentes de uma estação de tratamento de esgoto municipal em uma cidade na Alemanha. Neste mesmo trabalho, os autores detectaram em águas superficiais que recebem esses efluentes tratados provenientes desta ETE concentração de 19,42 ng.L<sup>-1</sup>, ou seja, dentro da faixa detectada no presente trabalho.

A concentração de 8,06 ng L<sup>-1</sup> de EQ-E<sub>2</sub> detectada por Yang, J. et al. (2014) em águas superficiais de uma região altamente industrializada do sul da China foi praticamente a mesma detectada para o ponto 1 do presente trabalho, de 8 ng.L<sup>-1</sup>.

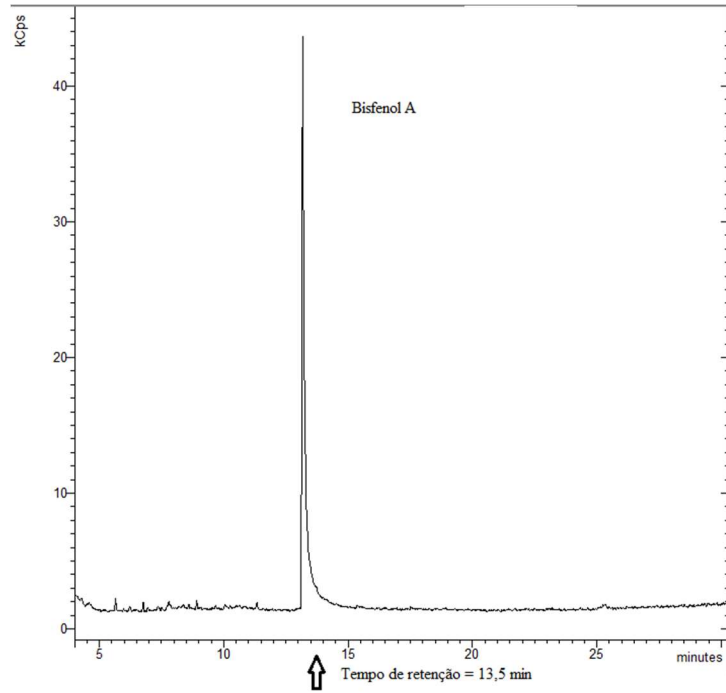
Foi observado que nos locais onde há um maior grau de poluição, como nesta região da China e na porção do rio na Alemanha que recebe descargas do efluente tratado, as concentrações de EQ-E<sub>2</sub> são maiores e estão próximas às encontradas no presente trabalho.

Outros trabalhos reportaram faixas de concentrações menores ou semelhantes às aquelas encontradas no presente trabalho, como pode ser observado na Tabela 4, p. 32.

#### **4.2. Análises cromatográficas do BPA no rio Guandu**

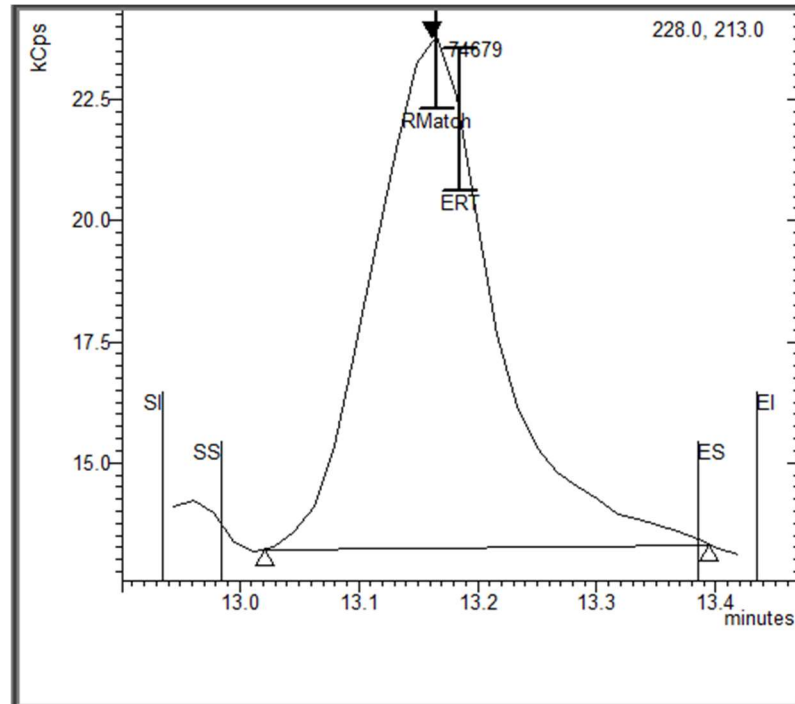
A solução padrão de BPA foi injetada inicialmente no CGAR-EM, no modo varredura de íons totais para detecção e obtenção do seu tempo de retenção. Após a determinação do tempo de retenção foram selecionados os íons com  $m/z$  213 e com  $m/z$  228 para análise no modo monitoramento seletivo de íons (MSI) (Figura 17 e 18) de modo a avaliar a sensibilidade do detector para o BPA em nível de ppb. A partir da definição dos íons e consequentemente da menor concentração detectada, foi construída uma curva analítica na faixa de 1 a 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Figura 19). Os cromatogramas relativos às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50, 75, 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de BPA estão apresentados na Figura 20.

Figura 117 - Cromatograma de monitoramento de íons seletivos para o BPA (m/z 213)



Fonte: O autor, 2016.

Figura 18 - Cromatograma do BPA mostrando o seu tempo de retenção e os íons monitorados



Fonte: O autor, 2016.

Figura 19 - Curva analítica do CGAR- EM – MSI do BPA nas concentrações de 2,29 - 73,70  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

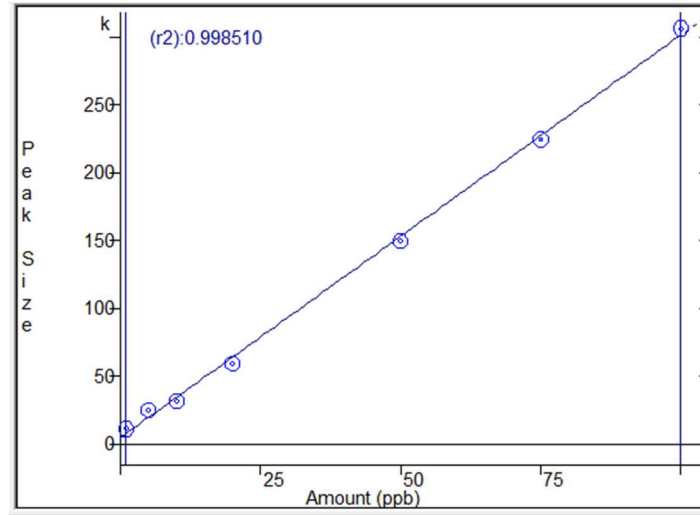
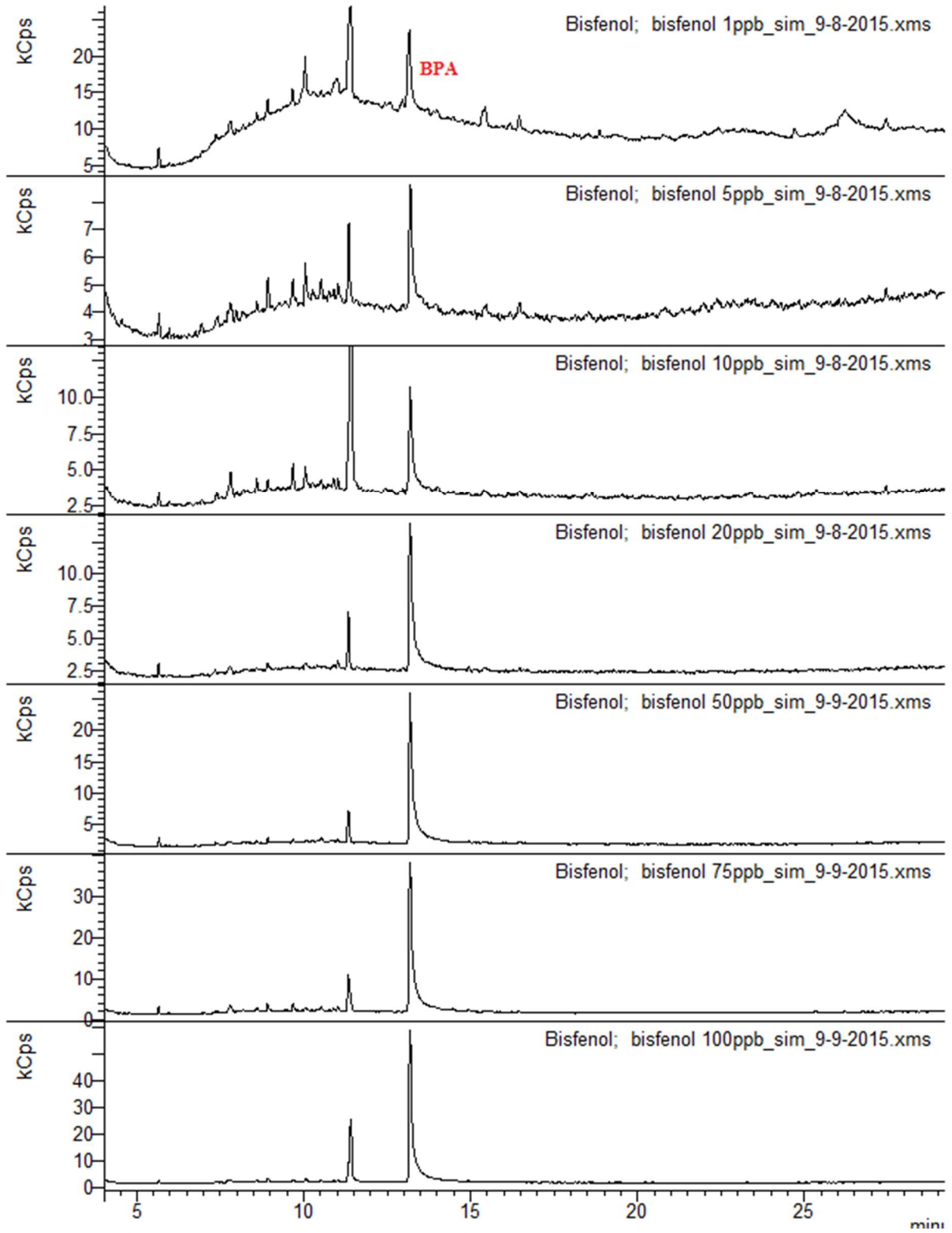


Figura 20 - Cromatogramas das concentrações da curva analítica do BPA na faixa de 1 a 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .



#### 4.2.1. Limites de detecção e quantificação do método

Para avaliar a eficiência do procedimento analítico desenvolvido e empregado durante a análise dos DE, alguns parâmetros fundamentais para validação de metodologia analítica foram determinados. Estes parâmetros foram avaliados quanto a eficiência da metodologia aplicada, a linearidade das curvas analíticas, o limite de detecção (LD) do equipamento e o limite de quantificação (LQ) do procedimento analítico. Os valores de  $r$  obtidos para todas as curvas analíticas estão em conformidade com os especificados pela ANVISA (0,99) ou pelo INMETRO ( $> 0,90$ ).

Os limites de detecção e quantificação do método desenvolvido para o BPA foram calculados utilizando a planilha de validação desenvolvida e reportada por Ribeiro & Ferreira (2008). A curva analítica do BPA apresentou um comportamento linear para a faixa de concentração de 2,29 a 73,70  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , com coeficiente de correlação de 0,9967. Os coeficientes de regressão e os limites de detecção e quantificação são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Coeficientes da curva de calibração e limites de detecção e quantificação do método desenvolvido para análise do BPA

Composto	LD ( $\mu\text{L}^{-1}$ )			LQ ( $\mu\text{L}^{-1}$ )		
	95%	99%	99,9%	95%	99%	99,9%
Bisfenol A	9,73	13,37	18,09	14,42	16,29	18,84

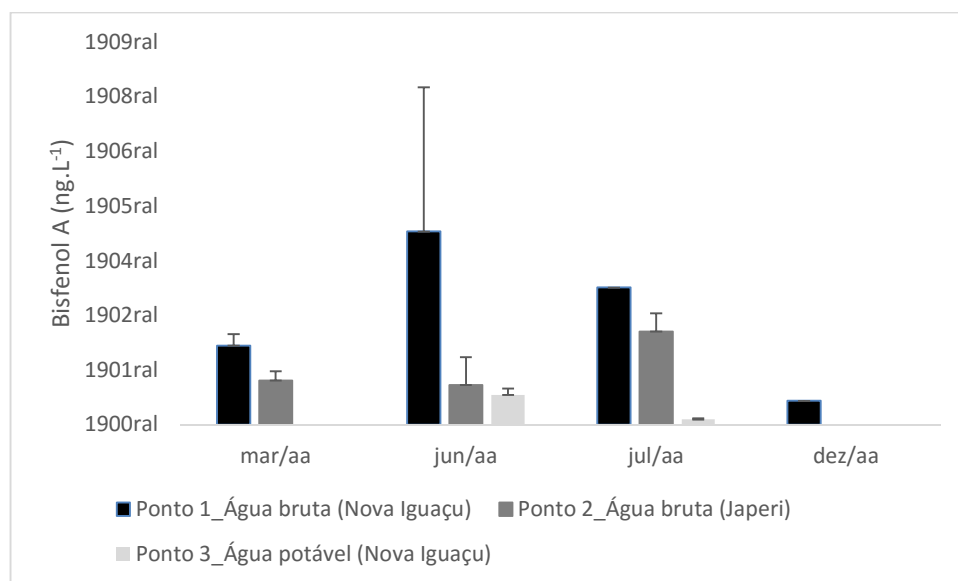
$a_0$  = coeficiente angular,  $a_1$  = coeficiente linear;  $r$  = coeficiente de correlação

#### 4.2.2. Identificação e quantificação do BPA em amostras de água bruta do rio Guandu e água potável por CGAR- EM – MSI.

A partir dos dados obtidos por meio da CGAR-EM-MSI, foi calculada a média aritmética e o respectivo desvio padrão das triplicatas para os resultados das concentrações de BPA detectadas nas amostras de água bruta e potável. O BPA foi detectado em 52% das amostras de todas as coletas realizadas no período de março a dezembro de 2015 com concentração máxima de 1766,9  $\text{ng.L}^{-1}$  no ponto 1.

Os resultados mostraram que das seis coletas realizadas, em três delas, foram detectadas concentrações de BPA nos dois pontos amostrados, porém nas coletas dos períodos de setembro e novembro não foram detectadas concentrações de BPA em nenhum dos dois pontos amostrados (Figura 21). A faixa das concentrações de água bruta variou de 219,8 ng.L<sup>-1</sup> a 1766,9 ng.L<sup>-1</sup> no ponto 1 e de 364,2 a 852,7 ng.L<sup>-1</sup> no ponto 2. O ponto 1, próximo a captação de água pela ETA Guandu, foi o que apresentou as maiores concentrações do BPA. A faixa de concentração de BPA na água potável variou de 49,7 a 273,1 ng.L<sup>-1</sup>.

Figura 21 - Coletas nas quais foram detectadas concentrações do BPA nas amostras de água bruta e potável.



O presente trabalho é o primeiro a avaliar as concentrações de BPA nas águas do rio Guandu. As concentrações de BPA detectadas neste estudo foram menores que as encontradas anteriormente em outros trabalhos semelhantes realizados em São Paulo. Beraldo (2012) relatou concentrações máximas de 295,255 µg.L<sup>-1</sup> em águas superficiais da cidade de Americana (SP) e Leandro (2006), constatou a presença de BPA entre 11,7 e 16,8 µg.L<sup>-1</sup> em água bruta e 6,2 e 7,3 µg.L<sup>-1</sup> na água potável da cidade de Araraquara (SP). No entanto, comparando com o trabalho realizado por Raimundo (2011), em Campinas, as concentrações reportadas no presente trabalho foram maiores, tanto em água bruta, quanto em água potável.

Em outros países, ainda em relação as águas superficiais, as concentrações encontradas na China por Zhang et al. (2011) e na Holanda por Verliefde et al. (2007), foram muito superiores que as do presente trabalho. Zhao et al. (2009) também encontrou concentrações geralmente mais elevadas, na faixa acima de 1000 ng.L<sup>-1</sup>, só ficando abaixo da

concentração mais elevada do ponto 1, que foi de 1766,9 ng.L<sup>-1</sup>. Em Portugal e na Espanha, Ribeiro et al. 2009 e Ballesteros-Gómez et al. (2007) detectaram concentrações semelhantes, enquanto que no Canadá, na Itália e na Suíça, Kleywegt et al. (2011), Loos et al. (2010) e Jonkers et al. (2009) encontraram concentrações bem menores que as do presente trabalho.

Comparando-se as concentrações de BPA detectadas em água potável no presente estudo com as detectadas nos outros trabalhos citados na Tabela 3, p. 28, somente na China e no Brasil as concentrações encontradas por Li et al. (2010) e Leandro (2006) foram maiores que as encontradas neste trabalho.

No Canadá e na França as concentrações encontradas por Kleywegt et al. (2011) e Baugros et al. (2008) estiveram na mesma faixa deste estudo e nos EUA e na Holanda as concentrações detectadas por Benotti et al. (2009) e Verliefde et al. (2007) foram bem menores que as do estudo atual.

Comparando com o abrangente estudo de Arnold et al. (2013), foi verificado que as médias máximas obtidas no presente estudo foram maiores que as máximas da Europa (14 ng.L<sup>-1</sup>), semelhantes às da América do Norte (99 ng.L<sup>-1</sup>) e menores que as encontradas na Ásia (317 ng.L<sup>-1</sup>).

Ao analisar a ampla faixa de concentrações do BPA em águas superficiais reportadas na literatura em diversas regiões, percebe-se que não há um padrão de ocorrência para esse composto, o que nos leva a constatar a necessidade de estudos de monitoramento do BPA nas águas utilizadas para abastecimento público.

#### **4.3. Compilação dos resultados do ensaio YES com os da cromatografia**

Mesmo que o BPA não seja um micropolvente persistente e seja biodegradado rapidamente (STAPLES, 1998), o fato de sua liberação ocorrer de forma contínua significa que ele pode ser frequentemente detectado em águas. Porém, a detecção das concentrações do BPA nas águas somente não é suficiente para avaliar a qualidade das mesmas em relação à presença de DE. Por esta razão, é essencial conhecer a atividade estrogênica total das amostras de água e a contribuição estimada que o BPA apresenta para esse total. A Tabela 12



mostra as concentrações do BPA, os valores de EQ-E<sub>2</sub> nas amostras de água, os valores de EQ-E<sub>2</sub> do BPA e o índice pluviométrico do período em que a coleta foi realizada.

Tabela 12 - Comparação entre a média das concentrações de BPA determinadas pela cromatografia, o EQ-E<sub>2</sub>, nas amostras de água bruta (ponto 1 e 2) e potável (ponto 3), o EQ-E<sub>2</sub> do BPA e o índice pluviométrico do período de cada coleta.

Coletas	Data	Pontos	BPA (ng.L <sup>-1</sup> )	EQ-E <sub>2</sub> água (ng.L <sup>-1</sup> )	EQ-E <sub>2</sub> BPA (ng.L <sup>-1</sup> )	Índice Pluviométrico (mm)
1	18/03/2015	Ponto 1	723,85	8	0,143	2
	18/03/2015	Ponto 2	404,4	32	0,080	2
2	10/06/2015	Ponto 1	1766,9	4	0,349	42
	02/06/2015	Ponto 2	364,2	-	-	42
	02/06/2015	Ponto 3	273,1	-	-	42
3	13/07/2015	Ponto 1	1257	-	-	45
	25/06/2015	Ponto 2	852,7	2,6	0,168	44
	25/06/2015	Ponto 3	49,7	-	-	44
4	23/09/2015	Ponto 1	ND	-	-	75
	23/09/2015	Ponto 2	ND	1,2	-	75
	23/09/2015	Ponto 3	ND	-	-	75
5	19/11/2015	Ponto 1	ND	1,2	-	84
	04/11/2015	Ponto 2	ND	1,8	-	58
	04/11/2015	Ponto 3	ND	-	-	58
6	04/12/2015	Ponto 1	219,8	1,6	0,0434	134
	04/12/2015	Ponto 2	ND	1	-	134
	04/12/2015	Ponto 3	ND	-	-	134

\*ND não detectado

Fonte: O autor, 2016.

Como observado na Tabela 12, o BPA não foi detectado na 4<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> coleta, com exceção do ponto 1. Porém, nessas mesmas coletas foi detectada atividade estrogênica. Presume-se então que foi a presença de outros compostos presentes nas amostras de água que proporcionaram a ocorrência da atividade estrogênica na forma de EQ-E<sub>2</sub>. No estudo realizado por Esteban et al. (2014), foram avaliadas as concentrações de trinta DE por LC/MS/MS, e atividade estrogênica das amostras de água da Espanha. Mesmo que o estudo não tenha sido realizado na bacia hidrográfica do rio Guandu, pode-se ter uma ideia da contribuição de cada grupo de substâncias para a atividade estrogênica geral detectada. O grupo dos alquifenóis e a estrona foram os compostos que mais contribuíram para a atividade estrogênica total enquanto que o BPA contribuiu bem pouco à estrogenicidade geral, tendo seus valores de EQ-E<sub>2</sub> ficado abaixo do limite de detecção. Como já discutido anteriormente, os grupos alquifenóis, ftalatos, hormônios esteróides e o 17 $\alpha$ -etinilestradiol já foram detectados no rio Guandu, então é possível que estes compostos também sejam responsáveis

pela atividade estrogênica detectada. No entanto, para uma avaliação mais precisa seria necessário um estudo mais abrangente no qual se avaliasse a ocorrência nessa matriz de outros grupos mais comuns de DE.

Em todos os pontos percebe-se que o EQ-E<sub>2</sub> do BPA foi menor que o EQ-E<sub>2</sub> total. No entanto, não foi possível calcular a contribuição do BPA na estrogenicidade total detectada, pois não foi levado em consideração o sinergismo ou a presença de substâncias antiestrogênicas na avaliação da atividade estrogênica das amostras.

Foi possível perceber uma redução da concentração do BPA e da atividade estrogênica, representada pelo EQ-E<sub>2</sub>, com o aumento do índice pluviométrico. O fato de haver uma maior diluição das águas em função do aumento da precipitação (chuva) poderia explicar a não detecção do BPA nas últimas as coletas e a diminuição da atividade estrogênica geral.

#### **4.4. Caracterização físico-química das amostras**

Segundo o boletim anual emitido pelo INEA para o ano de 2015 (INEA, 2015), com base nos resultados do monitoramento da Região Hidrográfica II (Guandu), as águas do rio Guandu foram classificadas naquele período como apropriadas para receber tratamento convencional visando o abastecimento público. Esse monitoramento é determinado por meio da aplicação do Índice de Qualidade de Água (IQ<sub>ANFS</sub>), que consolida em um único valor os resultados de alguns parâmetros físico-químicos.

As análises físico-químicas determinadas no presente trabalho correspondem a mais uma forma de caracterização da qualidade das águas potáveis e das águas do rio Guandu utilizadas para abastecimento. Os resultados referentes às amostras de água bruta (dispostos no ANEXO II) foram comparados com os parâmetros estabelecidos na Resolução CONAMA nº 357 (Brasil, 2005), que dispõe sobre o enquadramento dos corpos de água superficiais, bem como estabelece limites máximos para padrões físico-químicos e para emissão de poluentes. Segundo a Resolução, as águas utilizadas para abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional, como é o caso das águas do rio Guandu, são classificadas como sendo de classe 2.

Quanto ao teor de fósforo total, em todas as amostras de água do rio Guandu analisadas foram encontrados valores maiores do que o permitido pela Resolução CONAMA nº 357 (Brasil, 2005), que estabelece que, para ambientes lóticos (cuja água é corrente), o valor máximo permitido é  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  de fósforo.

A cor verdadeira foi outro parâmetro que não esteve dentro dos padrões exigidos pela Resolução CONAMA nº 357 (Brasil, 2005), excedendo o limite de  $75 \text{ mg Pt.L}^{-1}$  nos pontos 1 e 2 da 1ª coleta.

Para os parâmetros pH, cor verdadeira, turbidez, fósforo total e nitrogênio amoniacal, as amostras de água bruta apresentaram valores em conformidade com a Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005) para Classe 2.

Os resultados referentes às amostras de água potável (ponto 3) foram comparados com os parâmetros reportados na Portaria MS nº 2914 (BRASIL, 2011b), que dispõe sobre o padrão de potabilidade das águas. Os resultados da cor aparente do presente trabalho ultrapassaram os valores de referência da portaria que é de  $15 \text{ mgPt-Co.L}^{-1}$  na 2ª, 4ª e 5ª coletas. Os valores de turbidez, nitrogênio amoniacal, sólidos dissolvidos totais e pH obtidos para todas as amostras de água potável estão dentro do limite determinado pela Portaria nº 2.914/2011.

Todas as amostras de água bruta e potável coletadas apresentaram baixas concentrações de COD e de DQO, variando de  $1,64$  a  $7,7 \text{ mg.L}^{-1}$  e de  $5,76$  a  $31,07 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente, o que pode indicar um baixo teor de matéria orgânica na água.

Os valores de condutividade obtidos nas amostras são relativamente baixos (de  $82,04$  a  $137,7 \text{ } \mu\text{s.cm}^{-1}$ ). Embora não haja na legislação valores adequados de condutividade para a água, sabe-se que quanto mais íons presentes, maior será a condutividade, porém essa análise não especifica quais são os íons presentes em determinada amostra, mas pode fornecer uma possível evidência de poluição hídrica ocasionada por emissão de efluentes domésticos ou industriais.

## 5. CONCLUSÃO

O presente trabalho foi o primeiro a avaliar as concentrações de BPA nas águas do rio Guandu e na água potável de abastecimento público do Rio de Janeiro. A técnica de EFS somada a metodologia otimizada para CGAR-EM foi capaz de detectar e quantificar o composto BPA nas águas superficiais do rio Guandu e na água potável com limite de detecção e de quantificação de  $18,9 \mu\text{g.L}^{-1}$  e  $18,84$ , respectivamente para o nível de confiança de 99,9%. As concentrações detectadas para água bruta variaram de 219,8 a  $1766,9 \text{ ng.L}^{-1}$  no ponto 1, próximo a captação de água pela ETA Guandu, e de 364,2 a  $852,7 \text{ ng.L}^{-1}$  no ponto 2, mais distante do ponto de captação. Na água potável o BPA foi detectado na faixa de 49,7 a  $273,1 \text{ ng.L}^{-1}$ . As concentrações detectadas de BPA no rio Guandu corroboram a necessidade de manter o monitoramento ambiental deste poluente, visto que não existe legislação para regulamentar esse composto em águas.

O ensaio YES mostrou-se uma importante ferramenta de monitoramento e avaliação da qualidade da água bruta e potável do rio Guandu quanto à presença de atividade estrogênica, pois 75% das amostras de água bruta do rio Guandu analisadas apresentaram atividade estrogênica e o valor do EQ-E<sub>2</sub> máximo encontrado foi de  $32 \text{ ng.L}^{-1}$ , o que é preocupante, visto que concentrações superiores a  $1 \text{ ng.L}^{-1}$  podem causar riscos a organismos aquáticos. Mesmo que não tenha sido detectada atividade estrogênica para as amostras de água potável provenientes do rio Guandu, foram encontradas concentrações relevantes de BPA, o que não deixa de ser preocupante, visto que essa água é utilizada para abastecimento público.

Observou-se que com o aumento do índice pluviométrico, as concentrações de BPA e de EQ-E<sub>2</sub> diminuíram. A diluição causada pela precipitação pode ser um fator que influencia na concentração desse poluente.

Em matrizes ambientais estão presentes uma diversidade de DE. Como relatado na literatura, os compostos já detectados para o rio Guandu como hormônios esteroides, ftalatos e alquifenóis apresentam atividade estrogênica e por isso, podem estar contribuindo, da mesma forma que o BPA, para a atividade estrogênica total detectada pelo ensaio *in vitro* YES no presente trabalho.

## SUGESTÕES FUTURAS

- Continuar o monitoramento do BPA nas águas de abastecimento, porém considerando fatores como sazonalidade e condições climáticas e aumentar o número de pontos de amostragem.
- Utilizar padrão surrogate, como o bisfenol deuterado para avaliação do teste de recuperação.
- Utilizar padrão interno para correção de possível efeito matriz das amostras nas análises cromatográficas.

## REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA). *Panorama da qualidade das águas superficiais do Brasil: 2012*/Agência Nacional de Águas - Brasília: ANA, 2012. 264 p. 2012.
- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA). *Plano estratégico de recursos hídricos das bacias hidrográficas dos Rios Guandu, da Guarda e Guandu Mirim*. Brasília - DF: ANA, 2007. 130p. Relatório síntese.
- APHA; AWWA; WEF. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 22nd ed. Washington, DC. 1360 p., 2012.
- ARNOLD, S. M. et al. Relevance of drinking water as a source of human exposure to bisphenol A. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, v. 23, p. 137-144, 2013.
- BAKER, V. A. Endocrine Disrupters: Testing Strategies to Assess Human Hazard. *Toxicology in Vitro*, v. 15, p. 413-419, 2001.
- BALLESTEROS-GÓMEZ, A. et al. Determination of bisphenols A and F and their diglycidyl ethers in wastewater and river water by coextractive extraction and liquid chromatography-fluorimetry. *Analytica Chimica Acta*, v. 603, p. 51-59, 2007.
- BALSIGER, H. A. et al. A four-hour yeast bioassay for the direct measure of estrogenic activity in wastewater without sample extraction, concentration, or sterilization. *Science of the Total Environment*, v. 408, p. 1422-29, 2010.
- BAUGROS, J. B. et al. Multiresidue analytical methods for the ultra-trace quantification of 33 priority substances present in the list of REACH in real water samples. *Analytica Chimica Acta*, n. 607, p. 191-203, 2008.
- BECK, I. C.; BRUHN, R.; GANDRASS, J. Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen. *Chemosphere*, v. 63, p. 1870-1878, 2006.
- BENOTTI, M. J. et al. Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water; *Environmental Science Technology*, n. 43, p. 597-603, 2009.
- BERALDO, D. A. S. *Desenvolvimento e validação de método analítico para análise de bisfenol A e Nonilfenol em águas superficiais da cidade de Americana, SP*. 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- BERALDO, D. A. S. *Desenvolvimento e validação de método analítico para análise de bisfenol A e Nonilfenol em águas superficiais da cidade de Americana, SP*. 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- BERESFORD, N. et al. Issues arising when interpreting results from an in vitro assay for estrogenic activity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 162, p. 22-33, 2000.
- BILA, D. M. *Degradação e Remoção da Atividade Estrogênica do Desregulador Endócrino 17 $\beta$ -estradiol pelo Processo de Ozonização*. 2005. 281 f. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova*, v. 30, p.651-66, 2007.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no Meio Ambiente. *Química Nova*, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.
- BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment process, 1st ed., Boca Raton, FL: *Lewis Publishers*, 2003.
- BONEFELD-JORGENSEN, E. C. et al. Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review. *Environmental Health Perspectives*, v. 115, n.1, p. 69-76, 2007.

BRASIL, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357 de 17 de março de 2005, Diário Oficial da União, nº53, p. 58-63, Brasília, DF, 18 de março de 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. Resolução nº 41, 16 de setembro de 2011a. Dispõe sobre a proibição de Bisfenol A em mamadeiras destinadas a alimentação de lactentes e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 9 maio. 2011. Seção 1, p. 39 a 41.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011b. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914\\_12\\_12\\_2011.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html)> Acesso em 30 mar. 2016.

CALAFAT, A. M. et al. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environmental Health Perspectives*, v. 113, p. 391–395, 2005.

CASTRO-CORREIA, C.; FONTOURA, M. A influência da exposição ambiental a disruptores endócrinos no crescimento e desenvolvimento de crianças e adolescentes. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*, v. 10, n.2, p. 186-192, 2015.

CÉSPEDES, R. et al. Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 378, p. 697–708, 2004.

CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE (CAS). Disponível em: <<https://www.cas.org/>>, Acesso em: 10 jan 2016.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: Editora Unicamp, 2006.

COMPANHIA ESTADUAL DE ÁGUAS E ESGOTOS (CEDAE). *Relatório da administração de demonstrações financeiras 2014*. Rio de Janeiro: CEDAE, 2014. 13p.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E. et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews*, v. 30, n. 4, p. 293–342, 2009.

DIAS, A. C. et al. Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 120, p. 41-47, 2015.

DIETZ, R.; OUTRIDGE, P. M.; HOBSON, K. A. Anthropogenic contributions to mercury levels in present-day Arctic animals. A review. *Science of the Total Environment*, v. 407, p. 6120-6131, 2009.

DOMORADZKI, J. Y. et al. Age and dose dependency of pharmacokinetics and metabolism of bisphenol A in neonatal Sprague–Dawley rats following oral administration. *Toxicological Sciences*, v. 77, p. 230–242, 2004.

ESTEBAN, S. et al. Analysis and occurrence of endocrine-disrupting compounds and estrogenic activity in the surface waters of Central Spain. *Science of the Total Environment*, v. 466-467, p. 939-951, 2014.

ESTEBAN, S. et al. Presence of endocrine disruptors in freshwater in the northern Antarctic Peninsula region. *Environmental Research*, v. 147, p. 179-192, 2016.

EUROPEAN COMMISSION (EC). *Study on enhancing the endocrine disrupter priority list with a focus on low production volume chemicals*. ENV.D.4/ETU/2005/0028r. 249 p, 2007.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Toxicokinetics of bisphenol A – Scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC). *The EFSA Journal*, v. 759, p. 1–10, 2008.

EUROPEAN PARLIAMENT AND COUNCIL. DIRECTIVE 2008/105/EC, ANNEX III: Substances subject to review for possible identification as priority substances or priority hazardous substances. *Official Journal of the European Union*. 2008. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:348:0084:0097:en:PDF>>. Acesso em: 06 jun 2014.

FIC, A. et al. Estrogenic and androgenic activities of TBBA and TBMEPH, metabolites of novel brominated flame retardants, and selected bisphenols, using the XenoScreen XL YES/YAS assay. *Chemosphere*, v. 112, p. 362–369, 2014.

FOLMAR, L. C. et al. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environment Health Perspectives*, v. 104, p. 1096-1101, 1996.

FRISCHE, T. et al. Toxic masking and synergistic modulation of the estrogenic activity of chemical mixtures in a yeast estrogen screen (YES). *Environmental Science Pollution Research*, v. 16, p. 593-603, 2009.

GEROLIN, E. R. R. *Ocorrência e remoção de disruptores endócrinos em águas utilizadas para abastecimento público de Campinas e Sumaré – SP*. 2008. 185 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) - Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2008.

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

GIBERT, Y. et al. Bisphenol A induces otolith malformations during vertebrate embryogenesis. *BMC Developmental Biology*, v. 11, p. 4-20, 2011.

GIDDINGS, J. M.; ANDERSON, T. A.; HALL, L. W.; KENDALL, R. J.; RICHARDS, R. P.; SOLOMON, K. R.; WILLIAMS, W. M.; HOSMER, A. *Atrazine in North America Surface Waters: A Probabilistic Aquatic Ecological Risk Assessment*. 1 st ed. Pensacola, FL: SETAC Press, 2005.

GORE, A. C. et al. Introduction to endocrine disrupting chemicals (EDCs). A guide for public interest organizations and policy-makers. *Endocrine Society*, 70 p., 2014.

GRAY, L. E. J. et al. Endocrine Screening Methods Workshop Report: Detection of estrogenic and androgenic hormonal and antihormonal activity for chemicals that act via receptor or steroidogenic enzyme mechanisms. *Reproductive Toxicology*, v. 11, n. 5, p. 719-750, 1997.

HANSEN, P. D. et al. Vitellogenin – a biomarker for endocrine disruptors. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 17, n.7, p. 448-451, 1998.

HOEKSTRA, E.; SIMONEAU, C. Release of bisphenol A from polycarbonate a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 53, p. 386-402, 2013.

IKEZUKI, Y. et al. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Human Reproduction*, v. 17, n. 11, p. 2839-2841, 2002.

INOUE, K. et al. Quantitative detection of bisphenol A and bisphenol A diglycidyl ether metabolites in human plasma by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v. 765, p. 121-126, 2001.

INSTITUTO ESTADUAL DO AMBIENTE (INEA). Boletim de qualidade das águas da região hidrográfica II - Guandu. 2015. Disponível em: <[http://www.inea.rj.gov.br/cs/groups/public/documents/document/zwff/mdi3/~edisp/inea\\_027650.pdf](http://www.inea.rj.gov.br/cs/groups/public/documents/document/zwff/mdi3/~edisp/inea_027650.pdf)>. Acesso em: 15 dez. 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). Disponível em: <[http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede\\_estacoes\\_auto\\_graf](http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_auto_graf)>. Acesso em: 20 jan. 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*, DOQ-CGCRE-008, 2003.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Some industrial chemicals. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 77. World Health Organization. Lyon, France, 2000.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPCS). *A review of selected persistent organic pollutants - DDT-Aldrin-Dieldrin-Endrin-Chlordane; Heptachlor-Hexachlorobenzene-Mirex-Toxaphene; Polychlorinated biphenyls; Dioxins and Furans*. World Health Organization (WHO), 1995.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPCS). *Polychlorinated biphenyls: Human health aspects*. World Health Organization (WHO). Geneva, Switzerland, 2003.



- JEANNOT, R. et al. Determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry. *Journal of Chromatography, A*, v. 974, p. 143–159, 2002.
- JONKERS, N. et al. Mass flows of endocrine disruptors in the Glatt River during varying weather conditions. *Environmental Pollution*, v. 157, p. 714-723, 2009.
- KABIR, E. R.; RAHMAN, M. S.; RAHMAN, I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 40, p. 241-258, 2015.
- KIDD, K. A. et al. Human and wildlife exposures to EDC's. Chapter 3. *State of the science of endocrine disrupting chemicals*, p. 189–250, 2012.
- KLEYWEGT, S. Pharmaceuticals, hormones and bisphenol A in untreated source and finished drinking water in Ontario, Canada - Occurrence and treatment efficiency. *Science of the Total Environment*, v. 409, p.1481, 2011.
- KÖGER, C. S.; TEH, S. J.; HINTON, D. E. Determining the sensitive developmental stages of intersex induction in medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 beta-estradiol or testosterone. *Marine Environmental Research*, v. 50, p. 201-206, 2000.
- KÖRNER, W. et al. Validation and application of a rapid in vitro assay for assessing the estrogenic potency of halogenated phenolic chemicals. *Chemosphere*, v. 37, p. 2395-2407, 1998.
- KORTENKAMP, A. et al. *State of the Art Assessment of Endocrine Disruptors: A Final Report*. Revised version, 29 January 2012. 486 p., 2012.
- KRISHNAN, A. V. et al. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*, v. 132, n. 6, p. 2279-2286, 1993.
- KUSTER, M. et al. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental Waters from Rio de Janeiro (Brazil). *Environmental International*, v. 35, n. 7, p. 997–1003, 2009.
- LANÇAS, F. M. *Extração em fase sólida (SPE)*. Edição. São Carlos, SP: RiMa, 2004.
- LEANDRO, F. Z. *Bisfenol a: validação de método e ocorrência em água superficial e tratada da cidade de Araraquara*. 2006. 94 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.
- LEE, H. B.; PEART, T. E. Determination of bisphenol A in sewage effluent and sludge by solid-phase and supercritical fluid extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, v. 83, p. 290–297, 2000.
- LI, X. et al. Simultaneous determination and assessment of 4-nonylphenol, bisphenol A and triclosan in tap water, bottled water and baby bottles. *Environment International*, v. 36, p. 557-562, 2010.
- LICURGO, F. M. da S. *Desenvolvimento de metodologia para detecção de ftalatos e alquilfenóis em águas superficiais utilizando cromatografia gasosa e espectrometria de massas e avaliação de seus potenciais estrogênicos*. 2016. 116 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.
- LIU, R.; ZHOU, J.; WILDING, A. Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1038, n. 1-2, p. 179-189, 2004.
- LOOS, R.; LOCORO, G.; CONTINI, S. Occurrence of polar organic contaminants in the dissolved water phase of the Danube River and its major tributaries using SPE-LC-MS2 analysis. *Water Research*, v. 44, p. 2325-2335, 2010.
- LOPES, L. G. *Estudo sobre ocorrência de estrógenos em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal - SP*. 2005. 121f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

LÓPEZ-ROLDÁN, R. et al. Advanced monitoring of pharmaceuticals and estrogens in the Llobregat River basin (Spain) by liquid chromatography–triple quadrupole-tandem mass spectrometry in combination with ultra performance liquid chromatography–time of flight-mass spectrometry. *Chemosphere*, v. 80, p. 1337–1344, 2010.

LOUREIRO, I. R. *A importância e ocorrência de ftalatos em água potável e no ecossistema da Baía de Guanabara*. 2002. 143 f. Tese (doutorado em Química Analítica) – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.

LYCHE, J. L. et al. Reproductive and developmental toxicity of phthalates. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, v. 12, n. 4, p. 225-249, 2009.

MANSILHA, C. et al. Quantification of endocrine disruptors and pesticides in water by gas chromatography-tandem mass spectrometry. Method validation using weighted linear regression schemes. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 6681-6691, 2010.

MARKEY, C. M. et al. The mouse uterotrophic assay: a reevaluation of its validity in assessing the estrogenicity of bisphenol A. *Environmental Health Perspectives*, v. 109, p. 55–60, 2001.

MERCEA, P. Physicochemical process involved in migration of Bisphenol A from polycarbonate. *Journal of Applied Polymer Science*, v.112, p. 579-593, 2009.

MICHAŁOWIC, J. Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 37, p. 738–758, 2014.

MOL, H. G.; SUNARTO, S.; STEIJGER, O. M. Determination of endocrine disruptors in water after derivatization with N-methyl-N-(tert.-butyldimethyltrifluoroacetamide) using gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of chromatography A*, v. 879, n. 1, p. 97-112, 2000.

MOREIRA, D. S. *Desenvolvimento de metodologia analítica por cromatografia/espectrometria de massas para avaliação da ocorrência de perturbadores endócrinos em mananciais de abastecimento da região metropolitana de Belo Horizonte*. 2008. 124 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2008.

MOREIRA, D. S. et al. Occurrence of endocrine disrupting compounds in water sources of Belo Horizonte metropolitan area, Brazil. *Environmental Technology*, v. 30, p. 1041-1049, 2009.

MURK, A. J. et al. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. *Environmental Toxicology Chemistry*, v. 21, n. 1, p. 16-23, 2002.

NAM, S. H.; SEO, Y. M.; KIM, M. G. Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. *Chemosphere*, v. 79, p. 949–952, 2010.

NIESSEN, W. M. A. *Current Practice of Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. Chromatographic Science Series. Volume 86. New York: CRC Press, 2001.

NOLLET, L. M. L. *Chromatographic Analysis of the Environment*. Chromatographic Science Series. Volume 93. 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2006.

PACYNA, E. G. et al. Global emission of mercury to the atmosphere from anthropogenic sources in 2005 and projections to 2020. *Atmospheric Environment*, v. 44, n. 20, p. 2487-2499, 2010.

PÁDUA, V. L. *Remoção de microorganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano*. Projeto PROSAB. 1ª ed. Rio de Janeiro: ABES, 2009.

PAWLOWSKI, S. et al. Estrogenicity of solid phase-extracted water samples from two municipal sewage treatment plant effluents and river Rhine water using the yeast estrogen screen. *Toxicology in Vitro*, v. 18, p. 129-138, 2004.

PEREIRA NETTO, A. D. et al. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos HPAs) e seus derivados nitrados (NPHAs): uma revisão metodológica. *Química Nova*, v. 23, n. 6, p. 765-773, 2000.

- PETROVIC, M. et al. Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples. *Journal of Chromatography A*, v. 974, p. 23-51, 2002.
- PULGAR, R. et al. Determination of bisphenol A and related aromatic compounds released from bis-GMA-based composites and sealants by high performance liquid chromatography. *Environmental Health Perspectives*, v. 108, n. 1, p. 21-27, 2000.
- RAIMUNDO, C. C. M. *Contaminantes emergentes em água tratada e seus mananciais: sazonalidade, remoção e atividade estrogênica*. 2011. 172 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.
- 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) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- RAMIREZ, T. et al. Effect of estrogenic binary mixtures in the yeast estrogen screen (YES). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 70, p. 286-296, 2014.
- RIBANI, M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, p. 771-780, 2004.
- RIBEIRO, C. et al. Distribution of endocrine disruptors in the Mondego River estuary, Portugal. *Environmental Monitoring Assessment*, v. 149, p. 183-193, 2009.
- RIBEIRO, F. A. L. et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Química nova*, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.
- RICHARDSON, S. D. Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry*, v. 81, n. 12, p. 4645-4677, 2009.
- RICHARDSON, S. D. Environmental mass spectrometry: emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry*, v. 82, n. 12, p. 4742-4774, 2010.
- RICHTER, C. A. et al. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reproductive Toxicology*, v. 24, p. 199-224, 2007.
- ROBERTSON, L. W.; HANSEN, L. G. *PCBs: Recent Advances in Environmental Toxicology and Health Effects*. Lexington, KY: University Press of Kentucky, 2001.
- ROCHESTER, J. R. Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reproductive Toxicology*, v. 42, p. 132-155, 2013.
- RODGER-GRAY, T. P. et al. Exposure of Juvenile Roach (*Rutilus rutilus*) to Treated Sewage Effluent Induces Dose-Dependent and Persistent Disruption in Gonadal Duct Development. *Environmental Science Technology*, v. 35, n. 3, p. 462-470, 2001.
- RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; ALDA, M. J. L.; BARCELÓ, D. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1045, p. 85-92, 2004.
- ROGERS, J.; METZ, L.; YONG, W. Review: endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Molecular Immunology*, v. 53, p. 421-430, 2013.
- ROSE, J. et al. Vitellogenin induction by 17beta-estradiol and 17alpha-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology and Pharmacology*, v. 131, p. 531-539, 2002.
- ROUTLEDGE, E. J.; SUMPTER, J. P. Estrogenic Activity of Surfactants and Some of their Degradation Products Assessed Using a Recombinant Yeast Screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 15, n. 3, p. 241-248, 1996.
- RUBIN, B. S. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 127, p. 27-34, 2011.

RUTISHAUSER, B. V. et al. Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three in vitro assays and chemical analysis of steroids. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 23, n. 4, p. 857–864, 2004.

SANTAMARTA, J. A ameaça dos disruptores endócrinos. *Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável*, v. 2, n. 3, p. 18-29, 2001.

SCHUG, T. et al. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 127, p. 204–211, 2011

SECRETARIA DE ESTADO DE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL - SEMADS. *Bacias Hidrográficas e Recursos Hídricos da Macrorregião Ambiental 2: Bacia da Baía de Sepetiba*. Rio de Janeiro, 2001.

SELVARAJ, K. K. et al. GC–MS determination of bisphenol A and alkylphenol ethoxylates in river water from India and their ecotoxicological risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 99, p. 13-20, 2014.

SIFUENTES-ROMERO, I. et al. Vitellogenin in black turtle (*Chelonia mydas agassizii*): purification, partial characterization, and validation of an enzyme-linked immune sorbent assay for its detection. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 25, n. 2, p. 477–485, 2006.

SILVA, G. G. M. *Avaliação da qualidade de águas superficiais e de sedimentos quanto à toxicidade e atividade estrogênica*. 2015.118 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia Ambiental) - Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Sistema limpo em linha para extração em fase sólida de contaminantes emergentes em águas naturais. *Química Nova*, v. 33, n. 1, p. 216-219, 2010.

SOHONI, P.; SUMPTER, J. P. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *Journal of Endocrinology*, v. 158, p. 327–339, 1998.

SOTO, A. M. et al. The E-Screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*, v. 103, n. 7, p. 113-122, 1995.

SPARKMAN, O. D.; PENTON, Z. E.; KITSON, F. G. *Gas chromatography and mass spectrometry - A practical guide*. 2ª ed. San Diego: Elsevier, 2011.

SROGI, K. Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: A review. *Environmental Chemistry Letters*, v. 5, n. 4, p. 169-195, 2007.

STACKELBERG, P. E. et al. Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal of pharmaceuticals and other organic compounds. *Science of the Total Environment*, v. 377, p. 255-272, 2007.

STAPLES, C. A. et al. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*, v. 36, n. 10, p. 2149-2173, 1998.

SUN, Y. et al. Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection. *Biomedical Chromatography*, v. 18, p. 501–507, 2004.

TESKE, S. S.; ARNOLD, R. G. Removal of natural and xeno-estrogens during conventional wastewater treatment. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v. 7, n. 2, p. 107-124, 2008.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME AND THE WORLD HEALTH ORGANIZATION (UNEP & WHO). *State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals - 2012*. Geneva, Switzerland, 2013. 260p.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). *Interim registration eligibility decision for atrazine*, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, D.C., 20460. 2006.

- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US. EPA). *Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis*, Report n. EPA/630/R-96/012, Washington, D.C. 1997.
- VANDENBERG, L. N. et al. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology*, v. 24, p. 139 – 177, 2007.
- VEERASINGAM, S. A.; ALI, M. M. Assessment of endocrine disruptors – DDTs and DEHP (plasticizer) in source water: a case study from Selangor, Malaysia. *Journal of Water and Health*, v. 11, n. 2, p. 311–323, 2013.
- VEKÉI, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 921, n. 2, p. 227-236, 2001.
- VERDERAME, M. et al. Experimentally nonylphenol-polluted diet induces the expression of silent genes VTG and ER $\alpha$  in the liver of male lizard *Podarcis sicula*. *Environmental Pollution*, v. 159, n. 5, p. 1101–1107, 2011.
- VERLIEFDE, A. et al. Priority organic micropollutants in water sources in Flanders and the Netherlands and assessment of removal possibilities with nanofiltration. *Environmental Pollution*, v. 146, p. 281-289, 2007.
- VOKEL, W. et al. Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chemical Research in Toxicology*, v. 15, n. 10, p. 1281-1287, 2002.
- VOM SAAL, F. S.; HUGHES, C. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, v. 113, p. 926–933, 2005.
- WANG, J. et al. Inhibition of progesterone receptor activity in recombinant yeast by soot from fossil fuel combustion emissions and air particulate materials. *Science of the Total Environment*, v. 349, p. 120-128, 2005.
- WETHERILL, Y. B. et al. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reproductive Toxicology*, v. 24, p. 178–98, 2007.
- YANG, J. et al. Distribution and bioconcentration of endocrine disrupting chemicals in surface water and fish bile of the Pearl River Delta, South China. *Chemosphere*, v. 107, p. 439-446, 2014.
- YANG, R. et al. Combined effects of estrogenic chemicals with the same mode of action using an estrogen receptor binding bioassay. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 38, p. 829-837, 2014.
- YING, G. G. Analysis of endocrine disrupting chemicals and pharmaceuticals and personal care products in water. In: NOLLET, L. M. L. *Handbook of water analysis*. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007. Cap. 25, p. 693-727.
- ZAFRA-GÓMEZ, A. et al. Determination of some endocrine disrupter chemicals in urban wastewater samples using liquid chromatography-mass spectrometry. *Microchemical Journal*, v. 88, p. 87-94, 2008.
- ZHANG, Y. Z. et al. Behavior, mass inventories and modeling evaluation of xenobiotic endocrine-disrupting chemicals along an urban receiving wastewater river in Henan Province, China. *Water Research*, v. 45, n. 1, p. 292–302, 2011.
- ZHAO, J. L. et al. Determination of phenolic endocrine disrupting chemicals and acidic pharmaceuticals in surface water of the Pearl Rivers in South China by gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry. *Science of the Total Environment*, v. 407, p. 962–974, 2009.

## ANEXO I - Protocolo de Preparação das soluções do ensaio *in vitro* YES

### **Preparação da solução de Meio Mínimo**

A solução de meio mínimo (pH 7,1) foi preparada misturando-se os reagentes em 1 L de água ultrapura. A lista de reagentes segue abaixo:

- 13,61 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 1,98g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 4,2g de KOH peletes
- 0,2g de  $\text{MgSO}_4$
- 1 mL de solução de  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  (40 mg/50 mL de água ultrapura)
- 50 mg de L-leucina
- 50 mg de L-histidina
- 50 mg de adenina
- 20 mg de L-arginina-HCl
- 20 mg de L-metionina
- 30 mg de L-tirosina
- 30 mg de L-isoleucina
- 30 mg de L-lisina-HCl
- 25 mg de L-fenilalanina
- 100 mg de L-ácido glutâmico
- 150 mg de L-valina e
- 375 mg L-serina

### **Preparação da solução de Vitamina**

Após pronta, a solução foi filtrada e esterilizada em membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  estéril, e estocada a 4°C em frascos de vidro esterilizados. A solução de vitamina foi preparada pela adição dos seguintes reagentes em 180 mL de água:

- 8 mg de tiamina
- 8 mg de piridoxina
- 8 mg de pantetonato de cálcio
- 40 mg de inositol e
- 20 mL de solução de biotina (2mg/100 mL água)

### **Preparação da solução de Glicose**

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

### **Preparação da solução de Ácido L-aspártico**

A solução de ácido L-aspártico foi preparada na concentração de 4  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , com água ultrapura.

### **Preparação da solução de L-Treonina**

A solução foi preparada na concentração de 24  $\text{mg}/\text{mL}$  (600  $\text{mg}/25 \text{ mL}$ ) de L-treonina em água ultrapura.

### **Preparação da solução de Sulfato de Cobre (II)**

Uma solução de 20mM (0,5 g/100 mL) de sulfato de cobre (II) deve ser preparada, filtrada e esterilizada em membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  esterilizada. A solução deve ser estocada a temperatura ambiente em frascos de vidro esterilizados.

### **Preparação da solução de CPRG**

A solução de CPRG foi ser preparada na concentração de 10 mg/mL com água ultrapura e armazenada a 4°C em frascos de vidro esterilizados e cobertos para evitar a passagem da luz.

### **Preparação do meio de cultivo**

O meio de cultivo é preparado no dia do ensaio, a partir da mistura de 5 mL de glicose, 1,25 mL de ácido L-aspártico, 0,5 mL de vitamina, 0,4 mL de L-treonina, 125 µL de sulfato de cobre e 45 mL de meio mínimo.



## ANEXO II - Parâmetros físico-químicos das amostras de água bruta e potável

Coletas	Pontos	pH (25°C)	Condutiv. a 25°C ( $\mu\text{s.cm}^{-1}$ )	Turbidez (NTU)	Cor (mg Pt.L <sup>-1</sup> )		N amoniacal a 25°C (mg.L <sup>-1</sup> )	Fósforo (mg.L <sup>-1</sup> )	COD (mg.L <sup>-1</sup> )	SDT	SST	DQO (mg.L <sup>-1</sup> )
					Apa.	Verd.						
1ª coleta	Ponto 1	7,10	92,81	9	192	96	0,3	0,22	3,57	-	-	11,21
	Ponto 2	7,15	82,04	6	98	88	0,8	0,22	3,67	-	-	8,30
2ª coleta	Ponto 1	7,21	105	1,88	30	18	0,33	0,2	3,96	340	98	12,67
	Ponto 2	6,05	104,7	2,1	37	18	1,33	0,18	4,33	92	110	9
	Ponto 3	7,26	137,7	2,6	43	4	1,4	0,38	3,99	132	8	11,33
3ª coleta	Ponto 1	7,34	114,6	0,4	23	15	0,2	0,18	2,15	48	16	9,75
	Ponto 2	6,97	101,1	1,06	28	27	0,23	0,2	1,7	84	20	7,6
	Ponto 3	6,33	122,7	0,48	12	8	0,13	0,19	1,64	78	6	5,76
4ª coleta	Ponto 1	6,26	106,9	0,66	40	24	0,37	0,21	7,7	52	8	25,09
	Ponto 2	6,52	93,54	0,49	28	25	0,13	< 0,15	5,48	218	14	30,55
	Ponto 3	6,53	112,4	0,99	44	5	0,11	< 0,15	5,32	240	4	< LD
5ª coleta	Ponto 1	7,01	88,89	2,7	51	32	0,11	0,2	5,74	10	0	< LD
	Ponto 2	7,6	90,21	3,4	40	20	0,95	0,8	4,56	22	0	13,52
	Ponto 3	6,4	110,9	1,08	90	26	< 0,1	0,13	5,27	0	0	31,07
6ª coleta	Ponto 1	6,9	91,49	6,8	56	43	0,11	0,23	4,44	104	30	22,75
	Ponto 2	7,1	87,8	8,3	55	34	0,1	0,15	6,26	0	0	26
	Ponto 3	6,7	101,3	0,33	5	0	< 0,1	< 0,15	4,41	106	2	29,12

**ANEXO III - Curvas dose-resposta das amostras de água bruta e potável do rio Guandu**