



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro de Biociências  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Hudson Carvalho Ferreira

**O potencial da esponja marinha *Hymeniacidon heliophila* (Wilson, 1911) (Filo Porifera) como possível biomonitor de poluição por xenoestrógenos**

Rio de Janeiro

2018

Hudson Carvalho Ferreira

**O potencial da esponja marinha *Hymeniacidon heliophila* (Wilson, 1911) (Filo Porifera)  
como possível biomonitor de poluição por xenoestrógenos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial  
para obtenção do título de Mestre, ao Programa  
de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, da  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Gisele Lôbo-Hajdu

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

F383 Ferreira, Hudson Carvalho.  
O potencial da esponja marinha *Hymeniacidon heliophila* (Wilson, 1911) (Filo Porifera) como possível biomonitor de poluição por xenoestrógenos. – 2018.  
101f. : il.

Orientadora: Gisele Lôbo-Hadju  
Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Esponja - Teses. 2. Sistema endócrino - Regulação - Teses. 3. Hormônios - Teses. I. Lôbo-Hadju, Gisele. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 593.4

Patricia Bello Meijinhos CRB7/5217 -Bibliotecária responsável pela elaboração da ficha catalográfica

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

---

Assinatura

---

Data

Hudson Carvalho Ferreira

**O potencial da esponja marinha *Hymeniacidon heliophila* (Wilson, 1911) (Filo Porifera)  
como possível biomonitor de poluição por xenoestrógenos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial  
para obtenção do título de Mestre, ao Programa  
de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, da  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 09 de Julho de 2018.

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Beatriz Grosso Fleury  
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Alejandra Filippo Gonzalez Neves dos Santos  
Faculdade de Medicina Veterinária - UFF

---

Dra. Marília Teresa Lima do Nascimento  
Faculdade de Engenharia Ambiental - UERJ

---

Prof. Dr. Marcos Antônio dos Santos Fernandez  
Faculdade de Oceanografia - UERJ

Rio de Janeiro

2018

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a todo o ambiente marinho, ao qual jurei cuidar e defender através da Oceanografia*

## AGRADECIMENTOS

‘Primeiramente agradeço a Deus, pela sabedoria, e boas energias, as quais posso sentir quando encontro o mar, quando estou no mar e quando sou o mar’.

‘A minha amada esposa e amiga Maria José Carvalho Ferreira (*Cherrie*), por todo o incentivo, amizade, suporte e muita paciência durante todo o trabalho, obrigado por me apoiar hoje e sempre’.

‘A toda minha família, por todo amor e carinho, por me ensinarem o caminho da educação, do respeito e da humildade’.

‘Em especial, agradeço ao meu querido e amado pai Carlúcio Ferreira de Souza, por todo o carinho, amor, incentivo e amizade. Obrigado por me guiar pelo caminho da educação! Obrigado por ser minha inspiração’!

‘A minha Mãe Nilva Maria Barbosa. Obrigado por ter me criado da melhor forma possível. Agradeço pela torcida e por todo amor’!

‘A minha irmã Naiara Souza Barbosa, agradeço pelo incentivo durante essa jornada’.

‘A minha querida orientadora Prof. Dra. Gisele Lôbo Hajdu, por ter acreditado na proposta do trabalho, por todo apoio e paciência, por me mostrar os caminhos da ciência, da genética marinha e o mundo das esponjas. Não há palavras para agradecê-la. Obrigado por todo aprendizado e amizade’!

‘Aos professores Doutores do Depto. de Genética da UERJ, Thiago Silva de Paula e Marcelo Aguiar Costa Lima, por toda ajuda nos processos metodológicos, pelas discussões sobre genética marinha, pelos artigos, pela amizade e comentários preciosos’.

‘A toda equipe do laboratório de Genética Marinha da UERJ – LAGMar, agradeço pela torcida, apoio e ajuda nas coletas, bioensaios e géis utilizados nesse trabalho. Obrigado por tornarem o mestrado mais agradável’!

‘A Prof. Dra. Beatriz Grosso Fleury por ter aceito ser a revisora desse trabalho, obrigado pelas valiosas correções’.

‘A minha banca de defesa por terem aceito o convite, e por toda paciência em analisar essa dissertação’.

‘A Dayane Sereno, pela revisão da dissertação e artigos fornecidos’.

‘A Prof. Dra. Verônica Maria da Silva Morandi, do Depto. de Biologia Celular, por gentilmente ter cedido as instalações e equipamentos’.

‘A Prof. Dra. Geórgia Pacheco Peters de Almeida, do Depto. de Biologia Celular, agradeço por todo o material cedido para as análises do cDNA-AFLP’.

‘A todo o pessoal da Marinha Mercante, em especial aos amigos e tripulantes do navio PSV-Starnav Scorpius, agradeço por me aturarem durante 28 dias falando sobre RNA e cDNA, além de me cederem o espaço para a escrita e leitura da dissertação’.

‘A CAPES pela concessão da bolsa de estudos’.

‘A FAPERJ pelo consentimento da Bolsa FAPERJ - Nota 10’.

‘Aos professores e equipe do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – PPGEE’.

‘A todos que direta e/ou indiretamente, contribuíram para minha formação acadêmica e para essa pesquisa, agradeço por tudo’!

*“Lá em cima os albatrozes se mantêm imóveis no ar  
E nas profundezas das ondas  
Nos labirintos das cavernas de corais  
O eco de uma maré distante  
Vem magicamente pela areia  
E tudo é verde e submarino”*

*Echoes - Pink Floyd, 1971.*



## RESUMO

FERREIRA, Hudson Carvalho. *O uso da esponja marinha Hymeniacidon heliophila (Wilson, 1911) (Filo Porifera) como modelo experimental para a avaliação dos efeitos do hormônio sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol*. 2018. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Um problema ambiental fundamental enfrentado nos últimos anos é o dos micropoluentes emergentes, denominados desreguladores endócrinos, que são despejados nos oceanos. Dentre essas substâncias, o estrógeno sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol tem sido identificado como o principal composto responsável pelas alterações endócrinas em organismos aquáticos. Esta pesquisa teve como principais objetivos: a padronização de bioensaios de exposição da esponja *Hymeniacidon heliophila* (Wilson, 1911) ao estrogênio contraceptivo sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol, e o estabelecimento da técnica mais adequada de extração de RNA mensageiro total desta esponja marinha. Para tanto, durante três campanhas, esponjas marinhas da espécie *H. heliophila*, foram coletadas na região do costão rochoso da praia de Itaipu. Os indivíduos foram retirados vivos e inteiros do costão rochoso, sempre submersos em água marinha, e acondicionados em sacos plásticos transparentes contendo água do próprio local de coleta; onde permaneceram até serem aclimatados em aquário marinho de 200 litros previamente disposto no Laboratório de Genética Marinha (LGMar), na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Campus Maracanã. Foram realizados dois tipos de bioensaios com esponjas marinhas expostas ao hormônio sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol: A) Bioensaios de exposição utilizando aquários do tipo “beteira” com diferentes concentrações do hormônio: controle; 40; 200; 1000 e 5000 ng/L<sup>-1</sup> e diferentes tempos de exposição: 10; 40; 120 minutos; seis e 24 horas; B) Bioensaios em tubos tipo “Falcon™” de 50 mL, com a concentração do hormônio de 5000 ng/L<sup>-1</sup> e tempos de 40 e 120 minutos. Além disso, duas metodologias foram escolhidas para a extração do RNA: A) após os tempos de exposição preconizados, as amostras de esponjas foram contidas em RNAlater™ e armazenadas no freezer à -80°C até a extração do RNA; B) as extrações do RNA total das amostras de esponjas, foram realizadas imediatamente após os biosensaios. A espécie *H. heliophila* apresentou um ótimo desempenho para sua manutenção em laboratório, as duas condições de bioensaios analisados se mostraram bastante satisfatórios, pois não foi registrado sinais de estresse nos organismos durante seu manuseio para realização dos testes de toxicidade. A padronização das condições de manutenção em laboratório da esponja marinha *H. heliophila* e a determinação de um controle positivo de efeito nos dois tipos de bioensaios aplicados, contribuiu para o estabelecimento desse organismo como um modelo animal promissor a ser utilizado em ensaios ecotoxicológicos. O RNA obtido por meio do armazenamento das amostras de esponjas em freezer -80°C não apresentou padrão de fragmentação que permitisse a identificação de bandas no gel. Já o RNA total extraído imediatamente após o bioensaio, proporcionou o padrão esperado, isto é, a presença de duas bandas correspondentes ao RNA ribossomal 28S e 18S quando da sua análise em gel de agarose a 1%. Como resultado principal deste estudo temos o modelo de bioensaio de exposição a micropoluentes normatizado para a espécie modelo, *Hymeniacidon heliophila*, e para o poluente 17 $\alpha$ -etinilestradiol.

Palavras-chave: Biomonitorios de poluição. Desregulador endócrino. Micropoluentes. Porifera.

## ABSTRACT

FERREIRA, Hudson Carvalho. *The use of the marine sponge Hymeniacidon heliophila (Wilson, 1911) (Filo Porifera) as an experimental model for the evaluation of the effects of the synthetic hormone 17 $\alpha$ -ethinylestradiol.* 2018. 101 f. Dissertation (Master in Ecology and Evolution) – Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

A key environmental problem faced in recent years is that of emerging micropollutants termed endocrine disrupters, which are dumped into the oceans. Among these substances, synthetic estrogen 17 $\alpha$ -ethinylestradiol has been identified as the main compound responsible for the endocrine changes in aquatic organisms. The main objectives of this research were: standardization of exposure bioassays of sponge *Hymeniacidon heliophila* (Wilson, 1911) to synthetic estrogen contraceptive 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol, and establishment of the most appropriate technique for extraction of total messenger RNA from this marine sponge. For this purpose, during three campaigns, marine sponges of the species *H. heliophila* were collected in the region of the rocky shore of Itaipu Beach. The individuals were removed alive and intact from the rocky shore, always submerged in marine water, and packed in transparent plastic bags containing water from the collection site; where they remained until acclimatized in a marine aquarium of 200 liters, previously arranged in the Laboratory of Marine Genetics (LGMar), at the State University of Rio de Janeiro (UERJ), Maracanã Campus. Two types of bioassays were performed with marine sponges exposed to the synthetic hormone 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol: A) Exposure bioassays using "beta fish" type aquaria with different concentrations of the hormone: control; 40; 200; 1000 and 5000 ng / L-1, and different exposure times: 10; 40; 120 minutes; six and 24 hours; B) Bioassays in 50 mL "Falcon™" tubes, with the concentration of the hormone 5000 ng / L-1 and times of 40 and 120 minutes. In addition, two methodologies were chosen for RNA extraction: A) after the recommended exposure times, the sponge samples were contained in RNAlater™ and stored in the freezer at -80°C until RNA extraction; B) RNA extraction from the sponge samples were performed immediately after the bioassays. The *H. heliophila* species presented a good performance for laboratory maintenance, and the two bioassay conditions analyzed were quite satisfactory, since no signs of stress were recorded in the organisms during their handling for the toxicity tests. The standardization of the laboratory maintenance conditions of the *H. heliophila* marine sponge and the determination of a positive control of effect in the two types of bioassays applied, contributes to the establishment of this organism as a promising animal model to be used in ecotoxicological trials. The RNA obtained through the storage of the sponge samples in freezer -80°C did not present a fragmentation pattern that allowed the identification of bands in the gel. The total RNA extracted immediately after the bioassay provided the expected pattern, that is, the presence of two bands, when analyzed on 1% agarose gel, corresponding to ribosomal RNA 28S and 18S. As a main result of this study we have the model of bioassay of exposure to micropollutants standardized for the model marine sponge species, *Hymeniacidon heliophila*, and for pollutant 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol.

Keywords: Biomonitors of pollution. Endocrine disruptor. Micropollutants. Porifera.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática das principais fontes de poluição segundo TUCCI (1998).....	11
Figura 2 -	Gráfico com o resultado de busca textual no banco de dados Web of Science® com relação à quantidade de publicações ao longo dos anos, desde 1993 a 2017. Tópico pesquisado: <i>endocrine disruptors</i> .....	17
Figura 3 -	Sistema endócrino humano.....	18
Figura 4 -	Diferentes disfunções endócrinas causadas pelos desreguladores endócrinos.....	19
Figura 5 -	Classificação dos Desreguladores Endócrinos (DEs) quanto ao seu modo de ação baseado em Reys, 2001.....	20
Figura 6 -	Rotas de contaminação e exposição humana aos desreguladores endócrinos.....	25
Figura 7 -	Representação esquemática das classes de desreguladores endócrinos baseado em Bianco, 2010.....	26
Figura 8 -	Similaridade estrutural entre o estradiol e a genisteína.....	27
Figura 9 -	Representação das estruturas moleculares dos hormônios estradiol, estrona e estriol.....	28
Figura 10 -	Representação esquemática de alguns efeitos em organismos aquáticos expostos ao 17 $\beta$ -estradiol.....	30
Figura 11 -	Representação da estrutura molecular dos PCBs.....	31
Figura 12 -	Representação da estrutura molecular dos Ftalatos.....	32
Figura 13 -	Produtos comerciais que utilizam o ftalato em sua composição.....	33
Figura 14 -	Representação da estrutura molecular do bisfenol A (BPA) .....	34
Figura 15 -	Representação da estrutura molecular do Nonilfenol.....	35
Figura 16 -	Representação da estrutura molecular do Diuron.....	36
Figura 17 -	Aplicação de tinta antiincrustante em embarcação <i>offshore</i> .....	37
Figura 18 -	Exemplos de bioinscrustação em hélices de propulsão de embarcações <i>offshore</i> .....	38
Figura 19 -	Síntese do 17 $\alpha$ -etinilestradiol a partir do estrogênio natural estrona....	42
Figura 20 -	Hierarquia biológica e respostas a poluentes.....	46

Figura 21 -	Representação esquemática das principais características de um biomonitor ideal baseado em Phillips e Rainbow, 1993.....	48
Figura 22 -	Mapa da Distribuição da <i>Hymeniacidon heliophila</i> (Wilson, 1911).....	50
Figura 23 -	<i>Hymeniacidon heliophila</i> (Wilson, 1911).....	51
Figura 24 -	Mapa de localização das coletas de poríferos. Em destaque o costão rochoso da Praia de Itaipu.....	53
Figura 25 -	Coleta, transporte, e aquário marinho no Laboratório de Genética Marinha para aclimação e manutenção das esponjas.....	54
Figura 26 -	Aquário marinho para aclimação e manutenção das esponjas.....	56
Figura 27 -	Aquários de exposição ao hormônio sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol.....	57
Figura 28 -	Esquema dos bioensaios I com os diferentes grupos a serem analisados...	57
Figura 29 -	Processo de segmentação das esponjas.....	60
Figura 30 -	Esquema dos bioensaios II com os diferentes grupos a serem analisados	61
Figura 31 -	Ensaios de exposição da esponja ao hormônio 17 $\alpha$ -etinilestradiol.....	61
Figura 32 -	Síntese das principais etapas realizadas durante o experimento.....	62
Figura 33 -	Avaliação da integridade do RNA por gel de agarose e eletroforese – extraído de amostras armazenadas a -80°C.....	65
Figura 34 -	Avaliação da integridade do RNA por gel de agarose e eletroforese – extraído de amostras frescas.....	66
Figura 35 -	Ensaio piloto de exposição da esponja marinha <i>Hymeniacidon heliophila</i> (Wilson, 1911) (Porifera: Halichondrida) ao hormônio sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol e ao Biocida Diuron na concentração de (5000 ng/l <sup>-1</sup> ) em diferentes tempos (10; 30; 60; 180; 360 min e 24 horas).....	91

Figura 36 -	Ensaio de exposição da esponja marinha <i>Hymeniacidon heliophila</i> (Wilson, 1911) (Porifera: Halichondrida) ao Biocida Diuron em diferentes concentrações: 80; 400; 2000 e 10000 ng/l <sup>-1</sup> , utilizando diferentes tempos de exposição (10; 40; 120 min e 24 h).....	91
Figura 37 -	Ensaio piloto com esponjas marinhas <i>Suberites aurantiacus</i> (D & M, 1864) ao hormônio sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol em diferentes concentrações: 15; 60; 150 e 600 ng/l <sup>-1</sup> .....	92
Figura 38 -	Extração de RNA utilizando o Kit Direct-zol RNA Plus™ (Sinapse) - amostras do segundo experimento (MÉTODO I) armazenadas a -80°C....	93
Figura 39 -	Extração de RNA das amostras do terceiro experimento (dissociação de células) armazenadas a -80°C, com o método do <i>Trizol</i> (Invitrogen®) – poço 1 ao 4, e com o Kit de extração Direct-zol RNA Plus™ (Sinapse) – poço 5 ao 8.....	93

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Efeitos de alguns desreguladores endócrinos sobre diferentes organismos.....	21
Tabela 2 -	Concentrações Máximas do biocida diuron encontrado em amostras de água do mar retiradas de portos e marinas de diversos países.....	39
Tabela 3 -	Máximas Concentrações do hormônio sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol encontradas em diferentes matrizes e países.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DEs	Desreguladores endócrinos
$\mu\text{g L}^{-1}$	Microgramas por litro
$\text{ng L}^{-1}$	Nanogramas por litro
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DDE	Diclorodifeniltricloroetileno
EUA	Estados Unidos da América
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
IPCS	Programa Internacional de Segurança Química
BRF	Instituto Federal Alemão para Avaliação de Riscos
AEA	Agência Europeia de Saúde Ambiental
EU	União Européia
OMS	Organização Mundial de Saúde
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PCBs	Bifenilas policloradas
VTG	Vitelogenina
DEHP	Dietilhexilftalato
PVC	Policloreto de polivinila
BPA	Bisfenol A
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ETE	Estação de tratamento de esgoto
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
LGMar	Laboratório de Genética Marinha
cDNA	Ácido ribonucleico complementar
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase com transcrição reversa
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
Min	Minuto
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
PCR	Reação de amplificação seletiva
NCBI	<i>The National Center for Biotechnology Information</i>

## SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	11
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	15
1.1	<b>Desreguladores endócrinos.....</b>	14
1.2	<b>Sistema endócrino e os mecanismos de desregulação endócrina.....</b>	17
1.3	<b>Substâncias classificadas como desreguladores endócrinos.....</b>	24
1.4	<b>Substâncias naturais.....</b>	27
1.4.1	<u>Fitoestrógenos.....</u>	27
1.4.2	<u>Estrogênios Naturais.....</u>	28
1.5	<b>Substâncias Sintéticas.....</b>	30
1.5.1	<u>Bifenilas Policloradas (PCBs).....</u>	30
1.5.2	<u>Ftalatos.....</u>	32
1.5.3	<u>Bisfenol A.....</u>	34
1.5.4	<u>Aquilfenóis.....</u>	35
1.5.5	<u>Pesticidas.....</u>	36
1.5.6	<u>Fármacos.....</u>	40
1.5.6.1	<u>Antibióticos.....</u>	41
1.5.6.2	<u>O hormônio sintético 17<math>\alpha</math>-etinilestradiol.....</u>	41
1.6	<b>Biomonitoramento e Biomarcadores ambientais.....</b>	45
2	<b>OJETIVOS.....</b>	52
2.1	<b>Objetivo Geral.....</b>	52
2.2	<b>Objetivos específicos.....</b>	52
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	53
3.1	<b>Descrição do local de coleta das esponjas.....</b>	53
3.2	<b>Procedimento de coleta das esponjas.....</b>	54
3.3	<b>Preparo das soluções de exposição.....</b>	55
3.4	<b>Desenho Amostral.....</b>	55
3.5	<b>BIOENSAIOS I.....</b>	56
3.5.1	<u>Manutenção e aclimatização das amostras coletadas.....</u>	56
3.5.2	<u>Montagem do experimento.....</u>	57
3.5.3	<u>Extração do RNA e quantificação das amostras.....</u>	58
3.6	<b>BIOENSAIOS II.....</b>	59



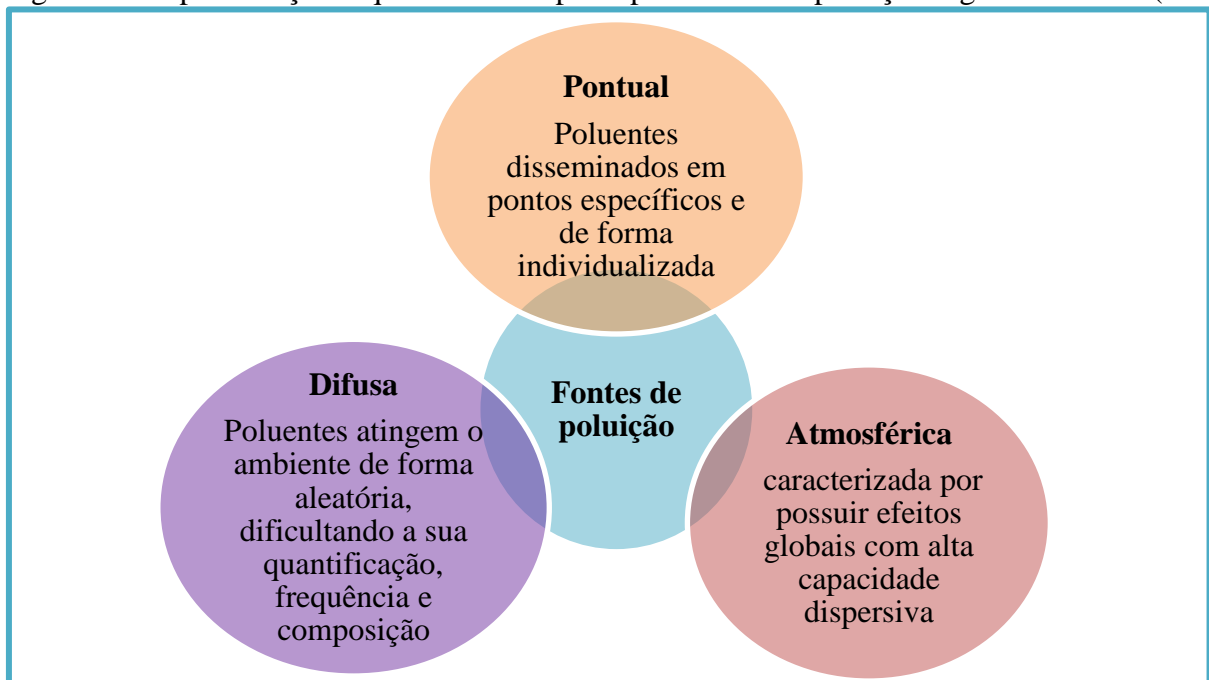
3.6.1	<u>Manutenção e aclimatização das amostras coletadas</u> .....	59
3.6.2	<u>Montagem do experimento</u> .....	58
3.6.3	<u>Extração do RNA e quantificação das amostras</u> .....	62
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	63
4.1	<b>Padronização dos ensaios de exposição ao estrogênio sintético 17<math>\alpha</math>- etinilestradiol</b> .....	63
4.2	<b>Extrações do RNA de <i>Hymeniacidon heliophila</i> (Wilson, 1911)</b> .....	64
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	68
	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	69
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	70
	<b>ANEXO A – Outros Bioensaios realizados durante a pesquisa</b> .....	92
	<b>ANEXO B - Extrações de RNA realizadas ao longo da pesquisa</b> .....	94

## INTRODUÇÃO

O ambiente marinho é explorado de diversas formas e com várias finalidades para o desenvolvimento humano, como na navegação, para a recreação e na aquicultura. É inegável que o crescente e exponencial aumento da população mundial, o desenvolvimento urbano e a expansão industrial, aliada a uma baixa responsabilidade ambiental, vêm ameaçando a sua qualidade e seus usuários (MORAES, JORDÃO, 2002; PEIXINHO, 2010).

Sob tal enfoque, a complexidade dos usos múltiplos desse ambiente, podem resultar nos processos que suscitam sua poluição, gerada de forma genérica pela entrada de substâncias ou formas de energia que, diretamente ou indiretamente, modificam suas características físicas e químicas, afetando e alterando a estrutura das populações e comunidades (PEREIRA, 2004; PIÑA et al., 2007). No entanto, o potencial efeito de um determinado poluente, depende de fatores intrínsecos à sua origem, uso, e concentração, bem como das características do corpo hídrico que o recebe. Assim, para Tucci (1998) as fontes de poluição podem ser classificadas em três tipos, representadas na figura 1.

Figura 1 – Representação esquemática das principais fontes de poluição segundo TUCCI (1998).



É oportuno lembrar que aproximadamente 40% da população mundial vive em regiões costeiras, nesse sentido, considerando o aspecto ocupacional, o ambiente marinho pode ser afetado pelos três tipos de poluição supracitados. Sabe-se também que a porção continental contribui com 70% da poluição marinha, e as atividades de transporte marítimo e de descarga no mar com 10% cada uma (AGENDA-21, 1995; NETO et al., 2008).

Esse cenário pode ser ainda mais alarmante nos países em desenvolvimento. A título de exemplo, no Brasil até 90% das águas residuais são lançadas sem qualquer tratamento nos ambientes costeiros, introduzindo substâncias que ameaçam a saúde e a biodiversidade de diversos ecossistemas, como lagunas, estuários, baías e manguezais (GESAMP, 1991; GEO-BRASIL, 2002; UNEP, 2006). Nesse particular, alguns desses poluentes são classificados como emergentes ou xenobióticos, ou seja, moléculas que não fazem parte da bioquímica usual de um organismo (WALKER et al., 1996; BITTENCOURT, et al., 2016).

Outro aspecto importante, é que em alguns casos esses elementos possuem a capacidade de interferir no sistema endócrino de humanos e animais, e, por isso, receberam a denominação de desreguladores endócrinos, que vem da tradução do termo em inglês “*endocrine disruptors*” (SILVA, CONFORTI, 2013). Os desreguladores endócrinos (DEs) são geralmente detectados em concentrações muito baixas na ordem de  $\mu\text{g L}^{-1}$  e  $\text{ng L}^{-1}$ , e se destacam pela capacidade de acumular-se ao longo da cadeia trófica e por alterar o sistema endócrino de diversos organismos, interferindo assim, em seu desenvolvimento e/ou comportamento (BILA, DEZOTTI, 2003, 2007; KORTENKAMP, et al., 2011).

No que concerne a capacidade de dispersão dessas substâncias, os DEs são amplamente encontrados no meio ambiente e em todas as regiões do mundo, pois englobam uma ampla variedade de produtos, que incluem hormônios naturais e sintéticos, compostos utilizados em cosméticos e pela indústria do plástico, componentes vegetais, pesticidas, entre outras substâncias (GUIMARÃES, ASMUS, 2010; GUILOSKI, 2014).

Múltiplos trabalhos evidenciam a relação desses xenobióticos com diversas anormalidades em animais e em humanos, como o desenvolvimento do câncer de mama, de útero e próstata, disfunções sexuais, aumento da incidência de ovários policísticos, distúrbios de fertilização masculina e feminina, irregularidades no crescimento de crianças e adolescentes, deficiência metabólica e imunológica em anfíbios, alterações histopatológicas e sexuais em gônadas de peixes, entre outras constatações (KUSTER et al., 2008; SCHIAVINI et al., 2011; ADEOGUNM et al., 2016; LUZIO et al., 2016; REGNAUT et al., 2016).

Dentre os vários grupos químicos de DEs, o estrogênio sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) utilizado como principal composto em pílulas contraceptivas, e bastante empregado na reposição hormonal por mulheres em tratamento da menopausa, vem ganhando atenção por sua capacidade de acumular-se no tecido adiposo de humanos e de animais, e por produzir efeitos adversos aos organismos expostos em concentrações realmente muito baixas na ordem de  $\mu\text{g L}^{-1}$  e  $\text{ng L}^{-1}$  (BILA, DEZOTTI, 2007; SILVA, CONFORTI, 2013).

Algumas dessas implicações foram evidenciadas por Andersen e colaboradores (2006), que ao investigarem os efeitos de curto prazo do EE2 a uma concentração de 26,4 ng/L em machos de *Danio rerio*, um peixe tropical teleósteo, da família dos ciprinídeos, evidenciaram um aumento significativo da concentração de vitelogenina e da supressão dos níveis de testosterona desse organismo. Filby e colaboradores (2007) observaram o efeito do hormônio EE2 por 21 dias, a uma concentração conhecida de 10 ng/L sobre as expressões de um conjunto de 22 genes no fígado e gônadas envolvidos nos processos de reprodução, crescimento e desenvolvimento de machos e fêmeas de vairão (*Pimephales promelas*), um peixe de água doce encontrado nos Estados Unidos. Os autores notaram uma elevada indução de vitelogenina em ambos os sexos, associada com aumentos significativos na expressão do gene do RNAm de vitelogenina hepática. Além disso, os organismos apresentaram efeitos fenotípicos que indicavam a feminização de indivíduos machos, como números baixos de tubérculos nupciais. Em espécimes do sexo feminino, houve uma diminuição do crescimento do ovário.

É notório que, paralelo ao exposto, esses efeitos podem promover profundas modificações na biota, como a redução da biodiversidade, e a alteração da estrutura de populações e comunidades (PIÑA et al., 2007). Com o intuito de compreender e reverter esse cenário, a utilização dos programas de biomonitoramento podem contribuir como uma ferramenta integrada na detecção e diagnóstico dos aspectos biológicos dos ecossistemas, permitindo assim, a aplicação de metodologias para o estabelecimento de planos de ações e de investimentos, afim de atender às metas de qualidade, avaliação do nível de degradação e proteção ambiental (CALLISTO et al., 2005; SOUZA, FONTANETTI, 2007).

Com o desígnio de obter evidências científicas acerca das reflexões supracitadas, delimitou-se o seguinte objeto de pesquisa: O potencial da esponja marinha *Hymeniacidon heliophila* (Wilson, 1911) (Filo Porifera) como possível biomonitor de poluição por xenoestrógenos.

## APRESENTANDO A DISSERTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado encontra-se inserida na linha de pesquisa em 'Ecologia de Sistemas Marinhos e de Água Doce' do programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução (PPGEE) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), e vincula-se ao núcleo de pesquisa em "Genética Marinha, Molecular de Populações e da Conservação", no Laboratório de Genética Marinha (LGMar). Didaticamente é constituída em revisão teórica, objetivos, material e métodos, resultados e discussão, conclusões e finalmente, perspectivas futuras.

A revisão de literatura baseou-se em uma abordagem qualitativa, por meio de uma verificação integrativa, e visando responder à seguinte pergunta: 'O que foi produzido na literatura sobre o que são os desreguladores endócrinos e quais seus efeitos nos ecossistemas e organismos aquáticos?'

Para isso, realizou-se uma busca nas bases de dados *Web of Science*<sup>®</sup>, *Scielo*, CAPES, Google Acadêmico e *Science Direct*, utilizando as seguintes palavras chave em português e seus respectivos correspondentes em inglês: desreguladores endócrinos; desruptores endócrinos; interferentes endócrinos. Como filtro optou-se por artigos publicados a partir de janeiro de 1993 a dezembro de 2017.

Os artigos foram selecionados por meio dos seguintes critérios de inclusão: artigos disponíveis integralmente, publicação em inglês e/ou português em periódicos nacionais e internacionais e relação nas bases de dados mencionadas no período de janeiro de 1993 a dezembro de 2017. Artigos que se repetiam entre as bases, foram excluídos. A partir dessa etapa, os resumos foram avaliados, e os artigos que atenderam os critérios previamente estabelecidos, foram selecionadas para esta revisão, e lidos na íntegra.

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Desreguladores endócrinos

No ano de 1962, ao publicar o seu livro, *A primavera Silenciosa* (“*Silent Spring*”), Rachel Carson realizou uma ampla abordagem sobre os desreguladores endócrinos, embora o problema não tenha sido tratado por esse termo, sua pesquisa alertava sobre os riscos ambientais oferecidos sobre a má utilização dos pesticidas organoclorados, tal constatação desencadeou a proibição do uso do diclorodifeniltricloroetano (DDT) por parte de diversos governos (BAIRD, 2002).

Outro fato de grande importância, foi a descoberta da relação da incidência de câncer no sistema reprodutivo de filhas de mulheres que utilizavam o Dietilestilbestrol, um estrogênio sintético indicado como agente inibidor de aborto. Esse fármaco foi receitado para mais de cinco milhões de gestantes entre os anos de 1940 e 1970, essa investigação gerou um importante alerta do potencial risco desses compostos à saúde humana (BIRKETT, LESTER, 2003).

Mais adiante, durante a década de 1990, cientistas identificaram anomalias no sistema reprodutivo de crocodilos encontrados em um lago na Califórnia nos Estados Unidos da América (EUA). Por certo, essas alterações estavam associadas à exposição desses organismos ao pesticida DDT e ao seu metabólito diclorodifeniltricloroetileno (DDE). Em face a essa realidade, foram detectadas a diminuição das concentrações de testosterona plasmática, aumento da síntese de estradiol (hormônio sexual feminino) no sistema reprodutivo de machos e irregularidades morfológicas nas gônadas, como a redução do tamanho do pênis (GUILLETTE et al., 1996).

A propósito destas afirmações, é oportuno frisar que a possibilidade de desregulação do sistema endócrino por compostos sintéticos vem sendo discutida desde a década de sessenta. Por outro lado, o termo desregulador endócrino (DE) foi utilizado pela primeira vez em 1991, durante a Conferência Wingspread, nos EUA. A denominação foi introduzida na literatura científica, destacando que os químicos no ambiente possuem a capacidade de afetar o desenvolvimento do sistema endócrino e que esses efeitos de exposição são permanentes (CLEMENT, COLBORN, 1992).

Em seguida, no ano de 1995, durante um *workshop* realizado pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA), em Raleigh, Carolina do Norte, deliberou-se o primeiro significado do que constitui um DE, dessa forma definindo-o como:

Qualquer agente exógeno que interfira na produção, liberação, transporte, metabolismo, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais no organismo, responsável pela manutenção da homeostase e pela regulação dos processos de desenvolvimento (GOLOUBKOVA e SPRITZER, 2000, p.323).

Em 2007, o Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) adotou por meio de um consenso entre pesquisadores japoneses, americanos, canadenses e da União Europeia a seguinte definição:

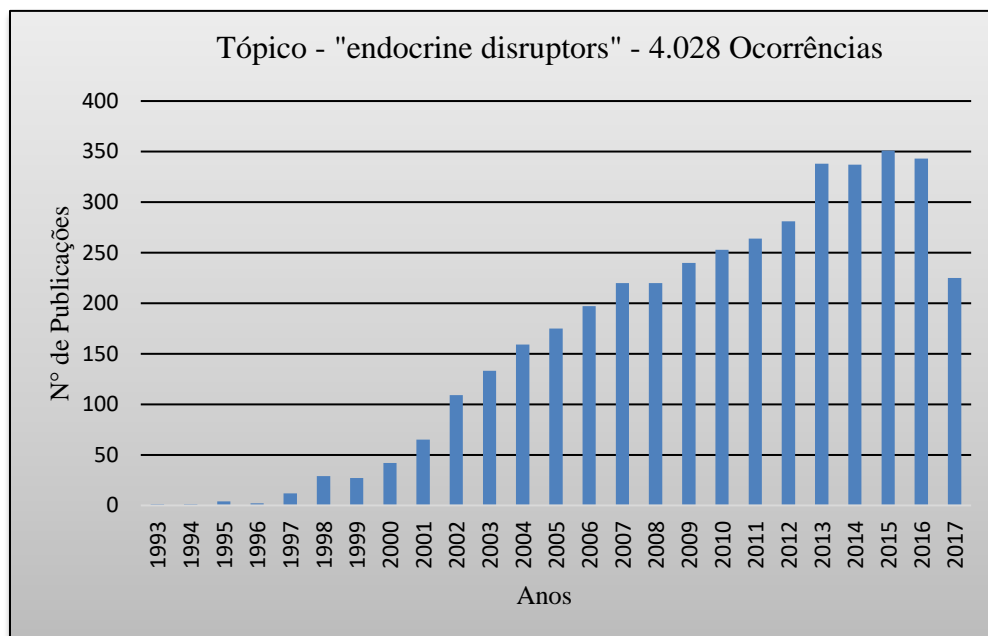
Um disruptor endócrino, é uma substância ou mistura exógena que altera a função(s) do sistema endócrino e, conseqüentemente, causa efeitos adversos à saúde em um organismo intacto, ou sua progênie, ou (sub) populações (CEC, 2001, p.5).

Em novembro de 2009, durante um *workshop* realizado na cidade de Berlim pelo Instituto Federal Alemão para Avaliação de Riscos (BFR), a definição sugerida pelo IPCS foi sancionada, todavia, o significado foi estendido pela adição do termo “reprodução”, modificando mais uma vez a definição de DEs (FAUST, KORTENKAMP, 2010). Ademais, em 2012, a Agência Europeia de Saúde Ambiental (AEA), e a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA) definiram os DEs como:

Substâncias exógenas que causam efeitos adversos na saúde de um organismo intacto e sua descendência, resultantes de alterações na função endócrina. Agentes exógenos que interferem com a produção, liberação, transporte, metabolismo, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais do corpo, responsáveis pela manutenção da homeostase e pela regulação dos processos de desenvolvimento, respectivamente (NOHYNEK et al., 2013, p.296).

Não há um consenso na comunidade científica sobre a delimitação do significado dos desreguladores endócrinos, porém, em síntese, todas as definições concordam que essas substâncias têm em comum a capacidade de interagir e modificar o funcionamento natural do sistema endócrino humano e animal (BIRKETT, LESTER, 2003; GHISELLI, JARDIM, 2007). Além disso, esses eventos e discussões fomentaram o interesse da comunidade científica a respeito do tema, pois ao realizarmos uma busca inserindo o termo em inglês “*endocrine disruptors*” na plataforma científica *Web of Science*<sup>®</sup> é possível notar um crescente número de publicações nos últimos 25 anos (Figura 2).

Figura 2 – Resultado de busca textual no banco de dados *Web of Science*<sup>®</sup> com relação à quantidade de publicações ao longo dos anos, desde 1993 a 2017. Tópico pesquisado: *endocrine disruptors*.



Fonte: *Web of Science*<sup>®</sup>, acessado em 24 de agosto de 2017.

Do mesmo modo, a tradução do termo em inglês “*endocrine disrupting chemicals*” para o português tem gerado conceitos diferentes. Portanto, podem ser encontradas as seguintes denominações: “perturbadores endócrinos”, “disruptivos ou disruptores endócrinos”, “desreguladores endócrinos”, “interferentes endócrinos” e “estrogênios ambientais” (GHISELLI, JARDIM, 2007). Aqui utilizaremos a terminologia Desregulador Endócrino (DE), já que essa é a nomenclatura adotada pela União Europeia nos textos em português (BILA, DEZOTTI, 2007).

## 1.2 Sistema endócrino e os mecanismos de desregulação endócrina

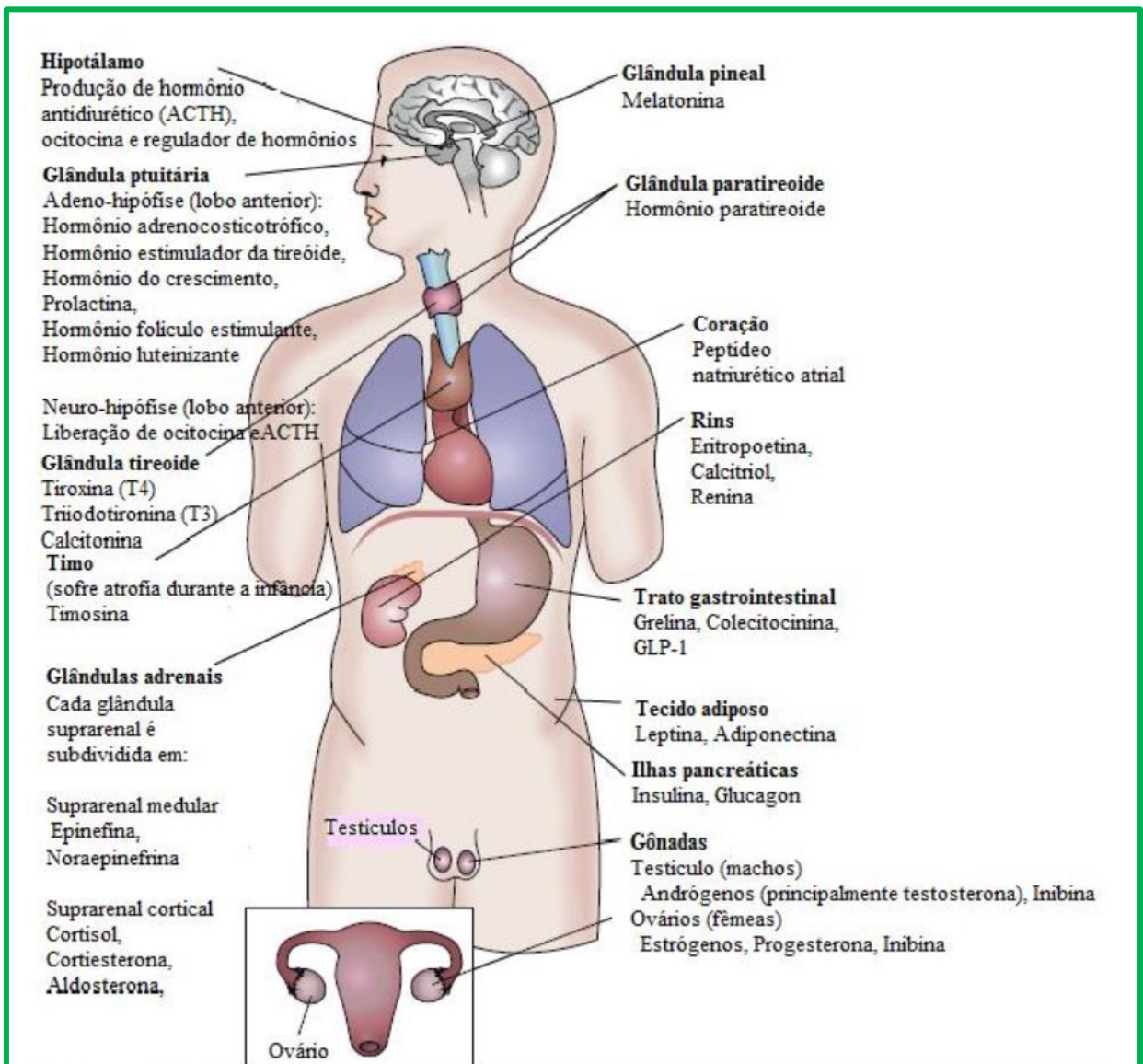
O sistema endócrino é o conjunto de glândulas responsáveis pela produção dos hormônios, os quais atuam como uma importante ferramenta para a coordenação do desenvolvimento e metabolismo dos seres vivos. Esse aparelho age por uma complexa rede de sinais e mensagens químicas, que possuem a capacidade de controlar funções e reações dos



organismos frente às perturbações exógenas (temperatura, fotoperíodo) e endógenas (período reprodutivo, ciclos circadianos), e no controle de características sexuais e reprodutivas em quase todos os organismos vertebrados e invertebrados (ZUBEY, 1995; LOUREIRO, 2002; CHAVES, 2016).

Em humanos, o sistema endócrino (Figura 3) é constituído por um conjunto de glândulas localizadas em diferentes áreas do corpo. A hipófise, por exemplo, localizada na base do cérebro, é responsável pela produção e liberação de hormônios, sendo considerada como a principal glândula desse conjunto (BERGMAN et al., 2013).

Figura 3 – Sistema endócrino humano.



Fonte: DIAS (2014).

Os mecanismos de acionamento do sistema endócrino têm início por meio das reações de células nervosas a determinados estímulos, enviando posteriormente um sinal as glândulas endócrinas, que por sua vez, liberam hormônios adequados que levam instruções para células alvo, onde se ligam a receptores específicos por meio dos mecanismos receptor-mediador (LOUREIRO, 2002; FONTENELE et al., 2010). O receptor interpreta a mensagem hormonal e faz a tradução mediante um de dois processos distintos (NOGUEIRA, 2003):

1 - Ordena aos genes a produção de novas proteínas, causando efeitos a longo prazo, como crescimento ou maturação sexual;

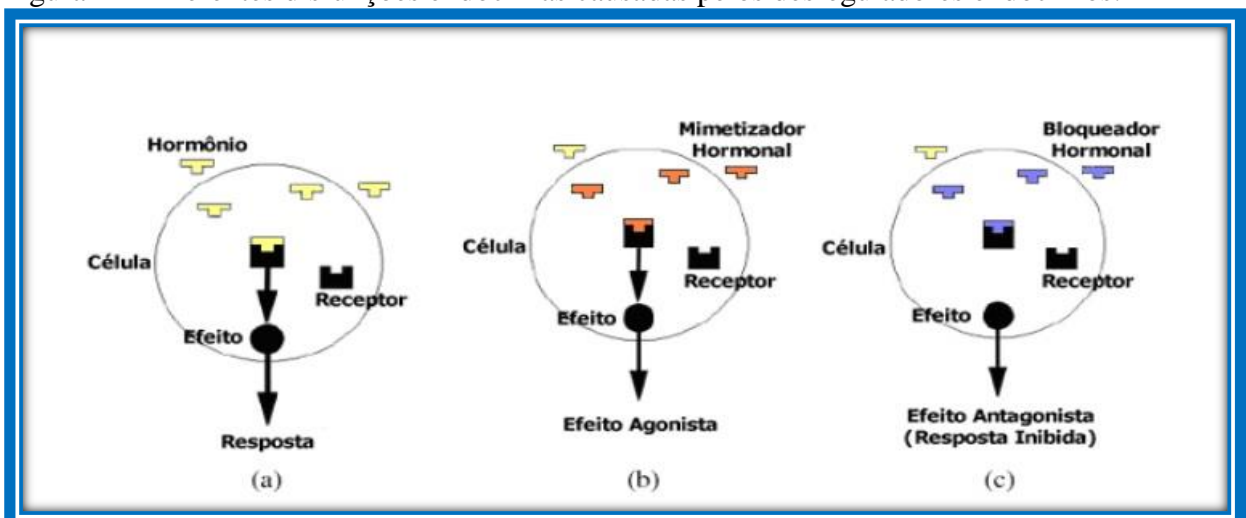
2 - Modifica a atividade de proteínas existentes na célula, promovendo uma resposta rápida por parte do organismo, que repercute em processos como alteração do ritmo cardíaco ou na variação do nível de glicose no sangue.

Todavia, os DEs são capazes de modificar a atividade hormonal, se ligando aos receptores celulares e alterando suas respostas normais por meio de dois efeitos diferentes (ROCHA, 2012):

1 - Efeito agonista – O DE pode mimetizar o hormônio, imitando seu efeito e ocupando os receptores hormonais (Figura 4B);

2 - Efeito antagonista – O DE age bloqueando os receptores hormonais naturais, inibindo a interação entre um hormônio natural e o seu respectivo receptor (Figura 4C).

Figura 4 – Diferentes disfunções endócrinas causadas pelos desreguladores endócrinos.



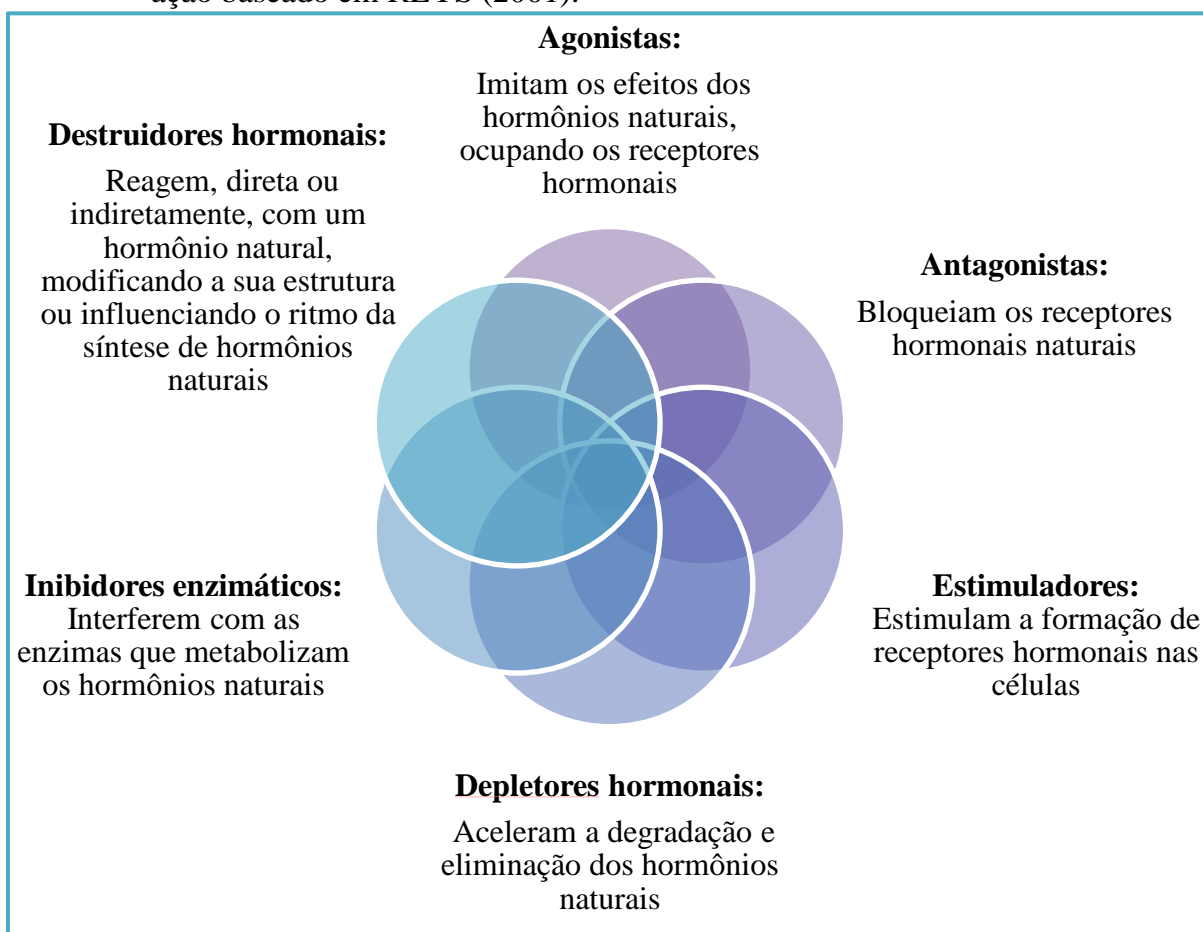
Legenda: (A) Resposta Natural; (B) Efeito agonista; (C) Efeito antagonista.

Fonte: GHISELLI e JARDIM (2007).

Quando as concentrações dos DEs são muito baixas, os efeitos podem ser produzidos por meio de uma resposta natural, contudo, nesse processo, os receptores hormonais também podem se ligar a outros compostos químicos, e, deste modo, ainda que em baixíssimas concentrações, esses poluentes são capazes de gerar um efeito dose–resposta (SOUZA, 2011).

Segundo Reys (2001), no que concerne aos DEs, estes são classificados segundo o seu modo de ação, como descrito na figura 5.

Figura 5 – Classificação dos Desreguladores Endócrinos (DEs) quanto ao seu modo de ação baseado em REYS (2001).



Os DEs têm sido tema de várias pesquisas científicas, a literatura tem confirmado diferentes implicações decorrentes da exposição de espécies animais a esses químicos (Tabela 1), e, diante dos indícios, acredita-se que em alguns casos, esses compostos possam causar o declínio de populações e comunidades (BILA, 2005; CUNHA, 2014).

Tabela 1 – Efeitos de alguns Desreguladores Endócrinos sobre diferentes organismos.

<b>Organismos</b>	<b>Desreguladores endócrinos (DEs)</b>	<b>Efeitos Observados</b>	<b>Referências</b>
	Bisfenol A Nonilfenol Etilbenzeno	Deformidades morfológica e diminuição das taxas de crescimento	HILL et al. (2002)
Porífera	Cádmio	Indução de proteínas metalotioneínas (MTLPs)	FRAZÃO (2013)
	Hidrocarbonetos Policíclicos aromáticos (HPAs)	Acúmulo de HPAs em tecidos	PEDRETE (2013)
	Dietilestilbestrol	Redução da sobrevivência e reprodução	HUTCHINSON et al. (1999)
Zooplâncton	17 $\alpha$ -etinilestradiol	Diminuição da diversidade e número de espécies	SCHRAMM et al. (2008)
	Diuron	Anomalias externas e Diminuição das taxas de sobrevivência	SHAALA et al. (2015)
Fitoplâncton	Atrazina e diuron	Inibição da fotossíntese	KNAUERT et al. (2008)

(Continua)

Tabela 1 – Efeitos de alguns Desreguladores Endócrinos (continuação).

Organismos	Desreguladores endócrinos (DEs)	Efeitos observados	Referências
Moluscos	Nonilfenol	Redução do desenvolvimento gonadal	BRIAN QUINN et al. (2006)
	17 $\beta$ -estradiol	Indução da síntese de vitelogenina	CIOCAN et al. (2010)
	17 $\alpha$ -etinilestradiol	Indução da síntese de Vitelogenina	ZHONG et al. (2014)
Peixes	Estrona 17 $\beta$ -estradiol 17 $\alpha$ -etinilestradiol	Retardo dos mecanismos de fuga	MCGEE et al. (2009)
	Flutamida; 17 $\alpha$ -etinilestradiol	Feminização de peixes	FILBY et al. (2007)
	Diuron	Estresse oxidativo dificultando a eliminação do composto	SANCHES (2014)

(Continua)

Tabela 1 – Efeitos de alguns Desreguladores endócrinos (continuação).

<b>Organismos</b>	<b>Desreguladores endócrinos (DEs)</b>	<b>Efeitos observados</b>	<b>Referências</b>
	Estrona 17 $\beta$ -estradiol 17 $\alpha$ -etinilestradiol	Indução da síntese de Vitelogenina	RANKOUHI et al. (2005)
Anfíbios	17 $\beta$ -estradiol 17 $\alpha$ -etinilestradiol	Diminuição do peso corporal e redução da sobrevivência	HOGAN et al. (2006)
	17 $\alpha$ -etinilestradiol	Redução da excitação sexual masculina (comportamento de chamada)	HOFFMANN e KLOAS (2012)
Humanos	Bisfenol	Redução da atividade endócrina do testículo fetal	N'TUMBA-BYN et al. (2012)
	Genisteína Bisfenol A Metoxicloro (HPTE)	Câncer do ovário	HALL e KORACH (2013)
Camundongos	Dibutilftalato (DBP)	Diminuição das concentrações de testosterona, espermatozóides e da motilidade	WANG et al. (2017)
	Bisfenol A	Aumento do comportamento de ansiedade	KUMAR e THAKUR (2017)

Fonte: O Autor, 2017.

### 1.3 Substâncias classificadas como desreguladores endócrinos

Diante da grande quantidade de comprovações científicas no que concerne a relação dos mais variados danos em diversos organismos causado pela exposição aos DEs, instituições como a União Europeia (UE), a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA), a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), têm dinamizado e apoiado diversas iniciativas com o objetivo primordial de distinguir e classificar claramente quais são as substâncias com potencial capacidade de desregulação endócrina (NOGUEIRA, 2002).

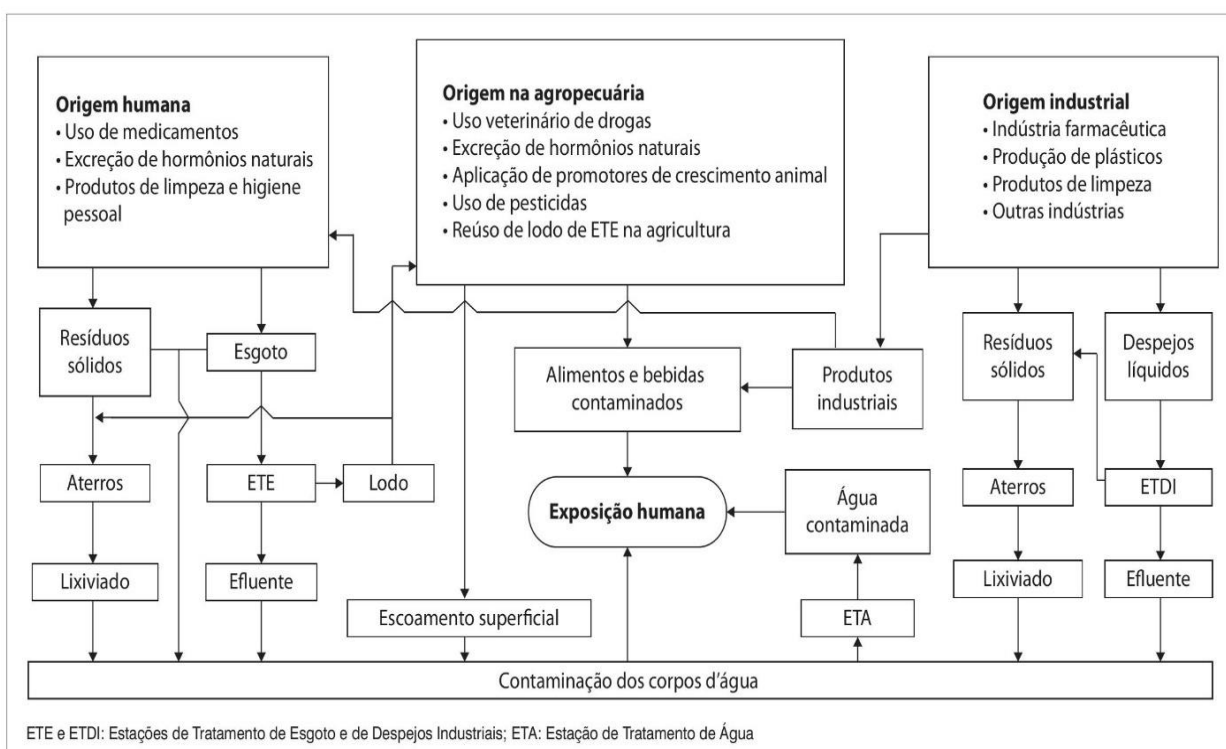
Como exemplo de ação, podemos citar a "*Community Strategy for Endocrine Disrupters*", esse ato foi aprovado em 1999 pela UE, e tem como desígnio responder de forma rápida e eficaz as preocupações relativas aos DEs a partir da criação de uma lista com 575 substâncias suspeitas de causar desregulação endócrina (SONNENSCHNEIN, SOTO, 1998; HAMID, ESKICIOGLU, 2012).

Outra medida importante, foi a concepção de uma legislação sobre a regulamentação dos produtos classificados como fitossanitários ("*Plant Protection Products Regulation/1107*"). Essa legislação foi elaborada junto à Comunidade Europeia em 2009, e possui poder deliberativo, que delimita que essas substâncias sejam geridas de forma diferenciada dos outros compostos, já que elas podem causar perturbações no sistema reprodutivo de humanos e animais, como a diminuição e/ou formato anormal de espermatozoides. Porém, a falta de consenso científico quanto a classificação das propriedades dos DEs, têm gerado conflitos quando esses produtos são inseridos no texto legal (SANSEVERIANO et al., 2001; LEWIS, 2013).

O Brasil ainda não possui nenhuma legislação própria, norma ou protocolo para a regulamentação desses poluentes no ambiente. A portaria n° 2.914 do Ministério da Saúde, de 12 de dezembro de 2011, estabelece critérios para o controle e qualidade da água para consumo humano. Contudo, seu padrão de potabilidade não abrange os microcontaminantes emergentes, portanto, ainda que esses critérios sejam atendidos, os corpos hídricos podem não estar totalmente isentos de contaminantes, incluindo os DEs e outros tipos de produtos (CHAVES, 2016).

Ademais, muitas destas substâncias são persistentes nos ambientes aquáticos, acumulando-se no sedimento de rios e estuários, onde são facilmente transportadas a longas distâncias (ASSUNÇÃO, PESQUERO, 1999; MEYER et al., 1999; BAIRD, 2002). Apesar disso, os meios de exposição aos DEs não se resumem apenas ao contato com águas contaminadas (Figura 6), mas também a ingestão de alimentos tratados com DEs, como: carnes ou derivados de origem animal; resíduos de pesticidas em frutas e verduras; formulações a base de soja e os cosméticos, são importantes elementos de veiculação (CHAVES, 2016).

Figura 6 – Rotas de contaminação e exposição humana aos desreguladores endócrinos.

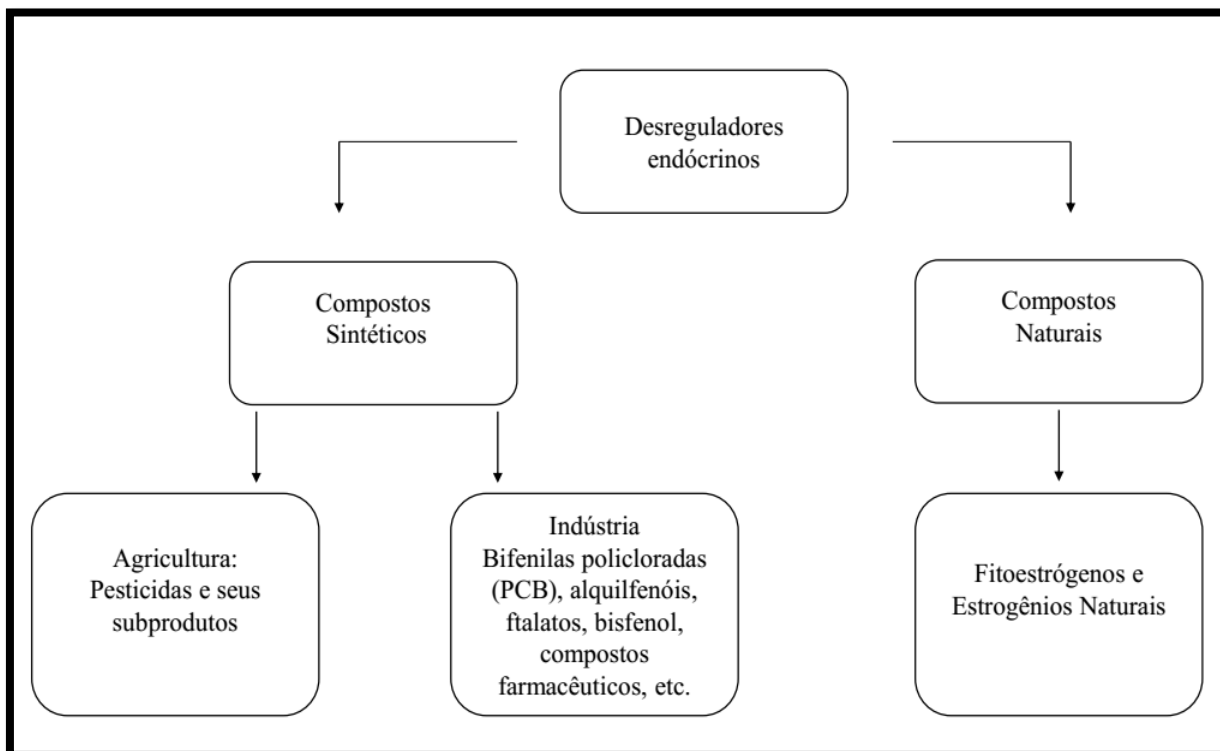


Fonte: AQUINO e colaboradores (2013).

Os Desreguladores endócrinos são constituídos por uma ampla variedade de compostos orgânicos e inorgânicos, e incluem substâncias naturais e sintéticas, agrupadas em duas classes (Figura 7), fator que facilita a disseminação desses poluentes no ambiente natural (BIANCO, 2010). Além disso, o grande número desses produtos, aliado aos requisitos técnicos e custos para mensurá-los, dificulta a determinação dos reais agravos provocados pelos mesmos (SILVA, CONFORTI, 2013).



Figura 7 – Representação esquemática das classes de desreguladores endócrinos baseado em BIANCO (2010).



As substâncias sintéticas compreendem os compostos artificiais utilizados na agricultura (pesticidas) e indústria (PCBs, alquilfenóis, ftalatos, bisfenol), além dos fármacos e dos hormônios sintéticos. Os produtos naturais incluem os fitoestrogênios - substâncias encontradas em algumas plantas e os hormônios naturais. No entanto, além dos DEs já conhecidos, muitas outras substâncias químicas têm demonstrado potencial para serem classificadas como DEs, além disso muitos outros novos compostos são sintetizados anualmente e aliçados para o meio ambiente, e, sendo assim, a lista atual dos produtos considerados DEs poderá aumentar (GHISELLI, JARDIM, 2007; FERREIRA, 2012).

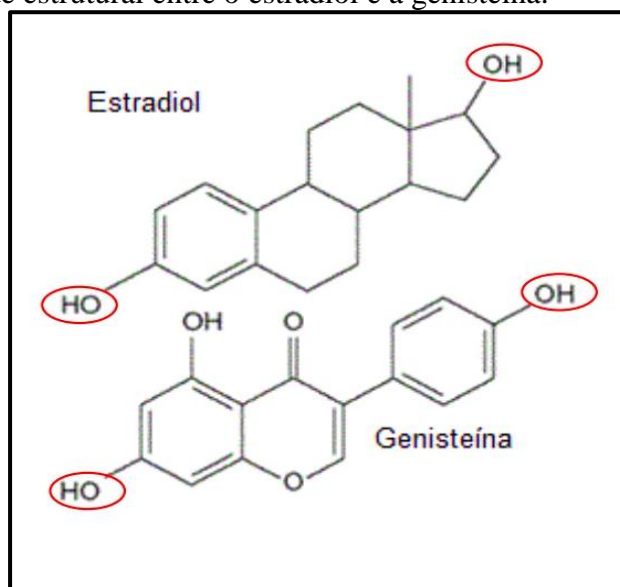
## 1.4 Substâncias naturais

### 1.4.1 Fitoestrógenos

Os fitoestrógenos, são substâncias vegetais, similares aos estrógenos ovarianos ou placentários. As isoflavonas (Genisteína e Daidzeína), constituem a maior classe de fitoestrógenos encontrados em plantas, e atuam na regulação hormonal, na proteção contra a radiação ultravioleta, ou ainda como herbicida natural (WHITTEN, PATISAUL, 2001; BIRKETT, LESTER, 2003; JEFFERSON et al., 2007).

Devido a sua estrutura (Figura 8), esses compostos são capazes de se ligar aos estrogênio receptores presentes nas células e induzir efeitos equivalentes aos produzidos por hormônios naturais, e, por isso, nesse sentido, são crescentes os incentivos globais para o consumo desse tipo de alimento como forma de alívio dos sintomas promovidos pela menopausa, o que pode aumentar o seu descarte no meio ambiente (CLAPAUCH et al., 2002; TSUBOY, 2012).

Figura 8 – Similaridade estrutural entre o estradiol e a genisteína.



Fonte: <http://quimicanova.s bq.org.br>.

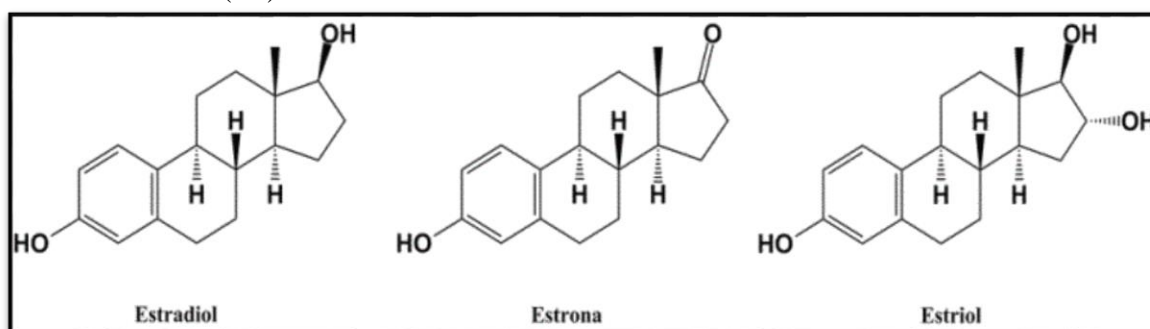
Entretanto, muitos dos genes alvo regulados pelo estrógeno são responsáveis pela coordenação do ciclo celular e, sendo assim, o próprio hormônio e as isoflavonas que mimetizam seu efeito já foram associados a alterações do sistema reprodutivo, e na proliferação aumentada de células tumorais de câncer de mama e de útero ER-positivas, favorecendo a promoção de tumores (ALVES et al., 2007; TOMAR, SHIAO, 2008).

Em vacas, o consumo a longo prazo de uma dieta rica em soja pode aumentar significativamente as taxas médias de infertilidade desses animais (ADAMS, 1995; WOCLAWEK-POTOCKA et al., 2005). As isoflavonas parecem ter efeitos deletérios também em roedores, promovendo o aumento do peso uterino e da espessura do epitélio endometrial e vaginal desses organismos, bem como tamanho reduzido dos testículos, dos epidídimos e vesículas seminais, além de próstata alargada e regulação da glicemia prejudicada (GALLO et al., 1999; RUHLEN et al., 2008; SANTOS et al., 2010).

#### 1.4.2 Estrogênios Naturais

Diariamente uma grande quantidade de estrogênios naturais são produzidos e lançados nos corpos hídricos, sendo os estrógenos naturais  $17\beta$ -estradiol, estriol e a estrona (Figura 9), os que despertam maiores preocupações. Esses hormônios, possuem a melhor conformação reconhecida pelos receptores e, portanto, resultam em respostas máximas, sendo considerados como responsáveis pela maioria dos efeitos desreguladores desencadeados pela disposição de efluentes nos corpos hídricos (MCLACHLAN et al., 2006).

Figura 9 – Representação das estruturas moleculares dos hormônios estradiol, estrona e estriol (E3).



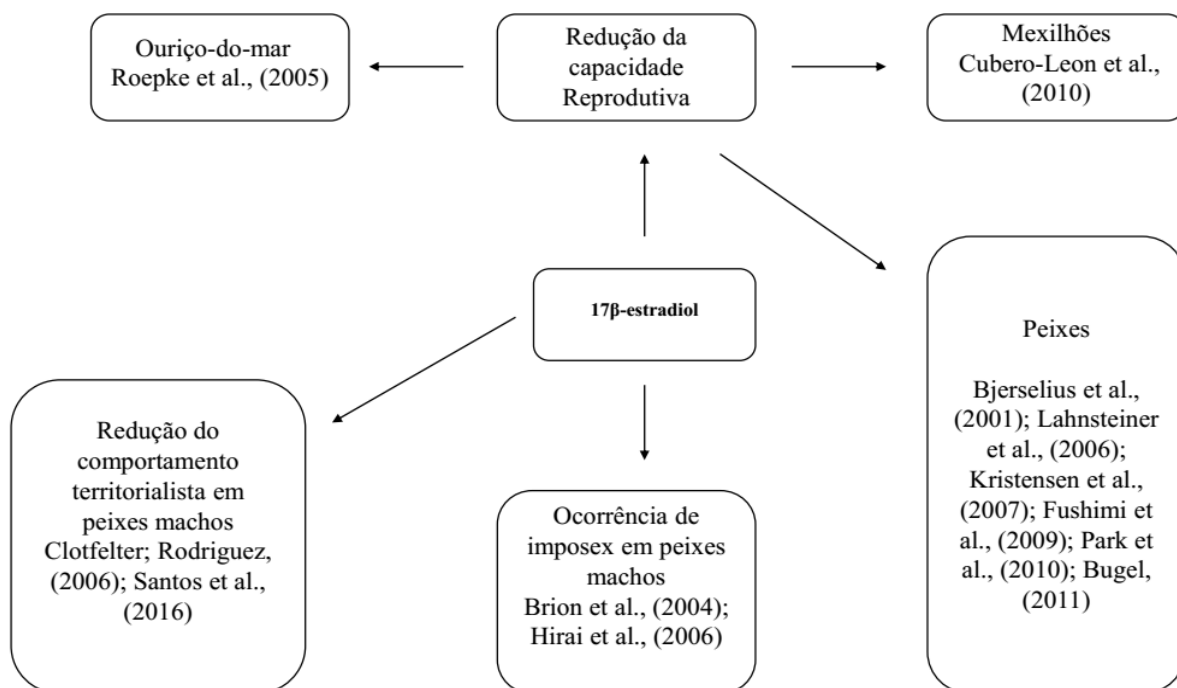
Fonte: <http://quimicanova.sbq.org.br>.

O 17  $\beta$ -estradiol é o principal hormônio humano, e pode ser produzido naturalmente ou sinteticamente, a estrona é um hormônio produzido predominantemente em mulheres na menopausa, já o estriol, é um estrogênio gerado naturalmente em grandes quantidades durante a gravidez (NOGUEIRA, 2003; HAMID, ESKICIOGLU, 2012; PEREIRA et al., 2013). Esses compostos são excretados principalmente pela urina e em menor proporção pelas fezes na forma de conjugados solúveis em água. Quando em condições ambientais, passam rapidamente por um processo de hidrólise, liberando hormônios livres e seus metabólitos no ambiente, os quais podem ser rapidamente absorvidos pelo organismo, e então metabolizados pelo fígado (DE FREITAS, 2000; ERICKSON, 2002; GHISELLI, JARDIM, 2007; GUIMARÃES, 2008; RIBEIRO et al., 2010).

O hormônio 17 $\beta$ -estradiol, possui alto potencial estrogênico, sendo considerado dentre os hormônios naturais como o mais potente, cerca de 12 e 80 vezes mais forte que os compostos estrona e estriol, respectivamente (COLDHAM et al., 1997; GUIMARÃES, 2008). Existem uma diversidade de trabalhos científicos na literatura que comprovam os efeitos desse poluente sobre vários táxons de organismos aquáticos. Em peixes, por exemplo, o estradiol é capaz de promover a síntese de vitelogenina. Essa proteína pode ser induzida em machos expostos a ambientes contaminados por substâncias estrogênicas (IRWIN et al., 2001; SANCHEZ, 2006).

A detecção da vitelogenina (VTG) plasmática é densamente analisada em muitos trabalhos. As análises correlacionam a expressão da VTG em peixes, como uma resposta fisiológica a presença do 17 $\beta$ -estradiol, *in vivo* ou *in vitro*, como demonstrado em alguns trabalhos: (HEMMER et al., 2002; MONCAUT et al., 2003; VAN DEN BELT et al., 2004; BANGSGAARD et al., 2006; HYNDMANA et al., 2010; SHAPPELL et al., 2010; DAMMANN et al., 2011; YAN et al., 2013). Todavia, outros estudos apontam divergentes efeitos em organismos expostos a esse poluente (Figura 10):

Figura 10 – Representação esquemática de alguns efeitos em organismos aquáticos expostos ao  $17\beta$ -estradiol.



Fonte: O autor, 2017.

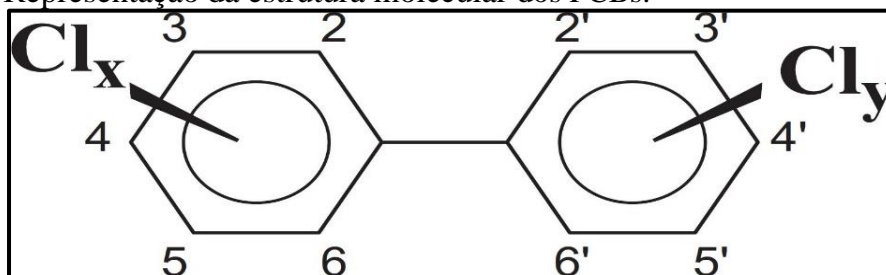
## 1.5 Substâncias Sintéticas

As substâncias sintéticas como as bifenilas policloradas (PCBs), os ftalatos, o bisfenol A, os pesticidas e os fármacos, possuem ação desreguladora e são persistentes no ambiente natural. Esses compostos, são facilmente transportados para outras regiões, e são detentores de uma grande capacidade de bioacumulação e biomagnificação ao longo da cadeia trófica, o que lhes confere grande atenção por parte dos órgãos ambientais e instituições de saúde pública (MEYER et al., 1999).

### 1.5.1 Bifenilas Policloradas (PCBs)

Bifenilas Policloradas (PCBs), é o nome genérico atribuído à classe de compostos organoclorados obtidos por meio de reação dos grupos bifenilas com cloro anidro na presença de catalisador. A quantidade de átomos de cloro presentes na molécula pode variar de 1 a 10 (Figura 11), e o arranjo de diferentes posições lhes confere a capacidade de se obter até 209 estruturas moleculares diferentes denominadas congêneres (PENTEADO, VAZ, 2001; DOS SANTOS et al., 2015).

Figura 11 – Representação da estrutura molecular dos PCBs.



Fonte: Adaptado de DOS SANTOS e colaboradores (2015).

Esses elementos apresentam alta estabilidade térmica, resistência química, baixa inflamabilidade e excelentes propriedades de isolamento elétrico, sendo avaliados por muitos, como o melhor fluido isolante existente, e, portanto, bastante aproveitados em transformadores e capacitores. São também aplicados como aditivos de óleos hidráulicos, plastificantes e adesivos. Suas propriedades químicas os tornam difíceis de serem degradados, e, deste modo, permanecem durante muito tempo no ambiente (REYS, 2001; WHALEY et al., 2001; LUNDQVIST et al., 2006; DOS SANTOS, et al., 2015).

A maior parte da população está exposta aos PCBs através do ar, da ingestão de água e alimentos, sendo este último o mais preocupante (WHO, 2003). Os PCBs são facilmente acumulados em tecidos gordurosos, e conseqüentemente, gêneros alimentícios como carnes, peixes e frangos e derivados lácteos, podem apresentar elevadas concentrações desses compostos, esses itens alimentícios contribuem com cerca de 14 a 19% do valor cumulativo dos PCBs, se comparados com outras formas de contaminação (WHO, 1999; LARINI, 1999; ATSDR, 2000; PENTEADO, VAZ, 2001; MALISCH, KOTZ, 2014). O consumo de produtos contaminados com PCBs, pode acarretar no aparecimento de problemas de saúde, como irritações da pele, nariz e pulmões, mal-estar gastrointestinal, alterações sanguíneas e hepáticas, ou até mesmo, depressão e fadiga, e cânceres como o da mama, do trato biliar, do fígado, estômago, intestino e próstata (PRINCE et al., 2006; ADENUGBA et al., 2009; ATSDR, 2011; RECIO-VEGA et al., 2011; KLINEFELTER, et al., 2018).

Durante a entrada dos PCBs na cadeia alimentar, esses compostos podem sofrer processos de bioconcentração e biomagnificação, e, por conseguinte, espécies predadoras apresentam tendência a altos fatores de bioacumulação em relação a suas presas (DA SILVA, 2009). Algumas pesquisas averiguaram elevadas concentrações de PCBs em diversos táxons marinhos considerados como topo de cadeia: elefantes-marinhos (DEBIER et al., 2006); focas (MOS et al., 2007; GABRIELSEN et al., 2011); tubarões (SILVA et al., 2009) e orcas

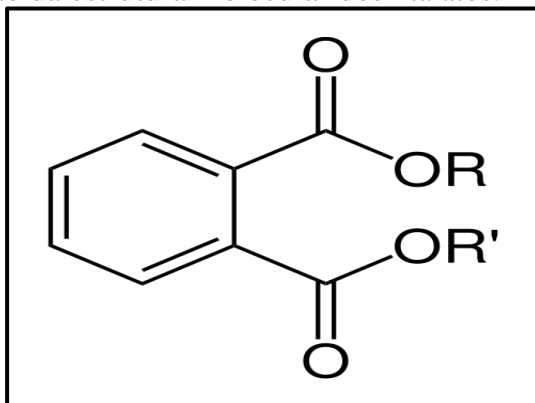
(HARAGUCHI et al., 2009). STUART-SMITH e JEPSON (2017), destacam que essas substâncias podem ser a principal causa de declínios contemporâneos nas populações europeias de cetáceos e, potencialmente, de outros predadores do topo da cadeia trófica marinha em todo o mundo. Devido à importância desses componentes biológicos, esse cenário é extremamente preocupante, pois os predadores de topo possuem um papel importante na regulação dos ecossistemas marinhos a níveis tróficos mais baixos, uma vez que controlam o crescimento populacional de suas presas, gerando efeitos *top-down* capazes de reestruturar a comunidade local (VIEIRA, 2007; HEITHAUS et al., 2012).

Ao mesmo tempo, os PCBs parecem poder reduzir o crescimento, o metabolismo e a formação esquelética de tartarugas da espécie *Malaclemys terrapin* (HOLLIDAY et al., 2009; HOLLIDAY, HOLLIDAY, 2012). Por outro lado, COLABUONO (2011) relatou a presença de PCBs em aves marinhas, devido principalmente à ingestão de plásticos que continham essas substâncias como parte de sua configuração. Os efeitos também foram observados em níveis tróficos basais. Em mexilhões, por exemplo, CANESI e colaboradores (2003) demonstraram que o PCB foi capaz de alterar parâmetros do sistema imune desses organismos.

### 1.5.2 Ftalatos

Os Ftalatos (Figura 12) foram sintetizados pela primeira vez na década de 1850, mas só encontraram aplicação no mercado de materiais de alta polimerização em 1920. A produção aumentou rapidamente nos anos 50, quando o ftalato - dietilhexilftalato (DEHP) foi sintetizado e testado com grande sucesso na flexibilização do policloreto de polivinila, mais conhecido pelo acrônimo PVC (LOUREIRO, 2002).

Figura 12 – Representação da estrutura molecular dos Ftalatos.



Fonte: <http://quimicanova.sbq.org.br>.

Atualmente, esses químicos são comumente aplicados em diversos itens industriais e domésticos (Figura 13), como os plastificantes usados na confecção de pisos poliméricos, acetato de polivinila (PVC), ou ainda como agente dispersante em inseticidas, repelentes, perfumes, móveis, roupas, aditivos de tintas, produtos farmacêuticos e de uso pessoal, couros sintéticos, etc. (BUSTAMANTE - MONTES et al., 2001).

Figura 13 – Produtos comerciais que utilizam o ftalato em sua composição.



Legenda: A. Materiais de limpeza; B. Produtos cosméticos; C. Plásticos; D. Materiais Hospitalares.

Fonte: Google imagens, 2017.

As principais vias de contaminação podem ocorrer por meio do despejo acidental ou intencional durante a manufatura, distribuição, uso e disposição final dos plastificantes, ou também pelo uso de equipamentos médicos à base de PVC (seringas e bolsas de sangue), visto que a maioria desses produtos contém o plastificante dietilhexilftalato (DEHP), e como esse elemento não é quimicamente ligado ao plástico, a sua propagação pode ocorrer por simples difusão para os meios ou fluidos em contato (ESTEVES et al., 2007; FERREIRA, MORITA, 2010; MACEDO, 2011).

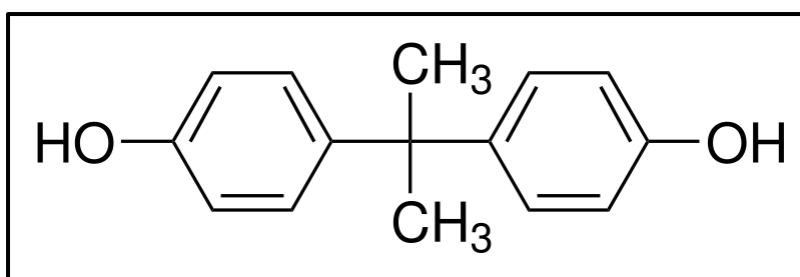


O contato prolongado com ftalatos, pode provocar disfunções reprodutivas em humanos, resistência à insulina e diabetes tipo II, sobrepeso e obesidade, anomalias esqueléticas, alergias, asma e cânceres (BENJAMIN et al., 2017). É notória a interferência desse agente na reprodução de peixes, com consequências ao crescimento larval e, maturação dos ovos (CARNEVALI et al., 2010). Em mamíferos, doses elevadas de certos ftalatos, promovem o desenvolvimento anormal dos órgãos genitais, que por vezes, ocasionam a infertilidade desses organismos (KA et al., 2011).

### 1.5.3 Bisfenol A

O composto sintético bisfenol A (BPA), é um monômero plástico policarbonato (Figura 14) utilizado comercialmente desde 1957 para produção de plásticos e resinas epóxi - BFA, possui alta estabilidade, flexibilidade e resistência. As resinas de BFA são empregadas em vários produtos, como camadas de revestimento interno de latas de alimentos e tubos de água, complexos dentários para obturações, embalagens de remédios, e uma variedade de bens de consumo – equipamentos esportivos, CDs e DVDs, entre outros (BROTONS et al., 1995; KOLATOROVAA et al., 2017; WANG et al., 2017).

Figura 14 – Representação da estrutura molecular do bisfenol A (BPA).



Fonte: <http://quimicanova.s bq.org.br>.

Devido ao seu potencial de migração a partir de materiais onde os alimentos são acondicionados, como latas e garrafas, a ingestão de comidas contaminadas, por sua vez, é apontada como a principal via de exposição humana (PIVNENKO et al., 2015; BJORNSDOTTER et al., 2017). As consequências do contato prolongado com o BPA vêm sendo acompanhadas por pesquisadores, instituições de pesquisa e órgãos reguladores. Em 2012, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proibiu a fabricação e

importação de mamadeiras e chupetas com a substância BPA, como também limitou a quantidade desse químico na produção de embalagens em contato com alimentos (KÖHLER, 2016).

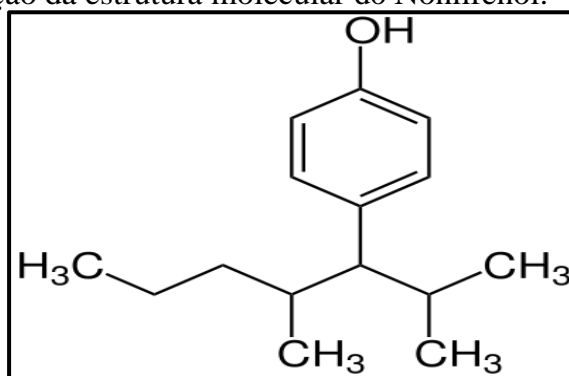
O BPA é suspeito de favorecer diversas disfunções em humanos: a) puberdade precoce; b) redução da fertilidade; c) doenças cardíacas; d) disfunção sexual; e) alterações no sistema nervoso; f) acréscimo da pré-disposição a doenças como o diabetes, câncer e obesidade; g) problemas de comportamento, como ansiedade, depressão e hiperatividade em crianças (DUPONT, 2011; HARLEY et al., 2013; KIM, PARK, 2013; SAVASTANO et al., 2015; SHEN, 2015; XIONG et al., 2015).

Em relação aos organismos aquáticos, são descritas mutações na fisiologia reprodutiva, e deformações do sistema imunitário de algumas espécies de peixes, moluscos e mamíferos (JOBILING et al., 2003; VOM SAAL, HUGHES, 2005; OLSVIK et al., 2009; HATEF et al., 2012).

#### 1.5.4 Aquilfenóis

Os alquilfenóis são uma classe de compostos orgânicos presentes em vários produtos domésticos e industriais. Entre esses químicos, o nonilfenol (Figura 15) merece especial atenção (OLIVEIRA et al., 2007). Formado pela alquilação do fenol com uma mistura de isômeros do nonano em presença de catalisador ácido, essa substância faz parte da composição de vários tipos de produtos, particularmente de tintas, látex, adesivos, pesticidas, couro sintético, dispersantes, fluidos, produtos farmacêuticos, e de higiene pessoal, itens de limpeza e cosméticos (DESHAYES et al., 2017; PRIAC et al., 2017).

Figura 15 – Representação da estrutura molecular do Nonilfenol.



Fonte: <http://quimicanova.s bq.org.br>.

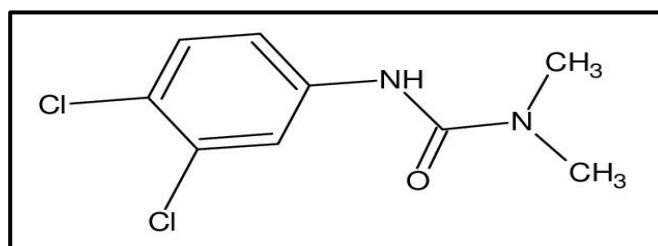
Apesar disso, essa substância pode promover distúrbios estruturais e funcionais adversos em humanos, como uma diminuição significativa da fertilidade, o aumento da frequência de disfunções hormonais, o hipertireoidismo, a endometriose, ou ainda, o crescimento da predisposição a cânceres, alergias, hiperatividade e problemas imunológicos (OLIVEIRA et al., 2007). Em organismos marinhos, baixas doses de exposição do nonilfenol são capazes de induzir características masculinas em fêmeas de gastrópodes (BASHEER et al., 2004).

#### 1.5.5 Pesticidas

Em princípio, a maioria das substâncias classificadas como desreguladores endócrinos são pesticidas (GHISELE, JARDIM, 2007). Esses químicos agem bloqueando processos metabólicos vitais aos organismos, e podem ser classificados de acordo com a sua função - inseticidas, herbicidas, fungicidas, algicidas, e/ou quanto ao seu modo de atuação - ingestão, contato, microbiano e fumegante (SANCHES et al., 2003). Considerando a grande aplicabilidade desses compostos, principalmente na agricultura, esse grupo ocupa uma notória posição dentre a diversidade de produtos sintéticos (DORES, DE-LAMONICA, 2001).

Não obstante, seu emprego pode ir além desse setor. A partir do banimento das tintas anti-icrustantes à base de organoestânicos, em razão dos problemas ambientais associados ao seu uso, uma terceira geração de tintas começou a ser utilizada, empregando-se diferentes compostos biocidas (CASTRO et al., 2011). Dentre eles, encontra-se o herbicida diuron (Figura 16), um cristal não-iônico, com moderada solubilidade em água  $42 \text{ mg l}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ , lipofílico e com forte adsorção ao sedimento, sendo bastante persistente no solo, possui meia-vida de 90 a 180 dias, e age bloqueando o transporte de elétrons no fotossistema na fase II, inibindo assim, a fotossíntese (GIACOMAZZI, COCHET, 2004; OTURAN et al., 2008; GIROTTI et al., 2012).

Figura 16 – Representação da estrutura molecular do Diuron.



Fonte: <http://quimicanova.sbq.org.br>.

Devido à sua alta eficácia como inibidor de crescimento de algas marinhas e de água doce, o diuron é empregado como princípio ativo de tintas anti-incrustante (READMAN, 1999). Essas tintas são aplicadas (Figura 17) como forma de proteger e combater o estabelecimento de organismos bioincrustantes em cascos de navios, plataformas petrolíferas, tubulações submarinas e tanques de aquicultura (THOMAS et al., 2000; CASTRO et al., 2011; BEVAN et al., 2012).

Figura 17 – Aplicação de tinta anti-incrustante em embarcação *offshore*.



FOTO: O autor, 2017.

Mais de 50% da frota mundial de navios apresenta algum grau de desenvolvimento de bioincrustação nos cascos ou hélices (Figura 18). A bioincrustação marinha é um processo resultante da colonização ou do crescimento de bactérias, algas e/ou invertebrados sésseis sobre superfícies submersas, sejam elas naturais - rochas, madeira, outros organismos, ou antrópicas - cais, plataformas, cascos de navios, boias, cabos (DA GAMA et al., 2009).

Figura 18 – Exemplos de bioinscrustação em hélices de propulsão de embarcações *offshore*.



Fontes: O autor, 2017.

Esse processo aumenta as taxas de corrosão e rugosidade nos cascos das embarcações, e, por conseguinte eleva a tensão cisalhante entre a água e a superfície de contato das mesmas, demandando um aumento de combustível de até 17% dependendo do grau de incrustação, porém a utilização de tintas antiincrustantes reduz o estabelecimento desses organismos (EVANS et al., 2000). No entanto, embora bastante utilizado na agricultura, o aumento da demanda de tintas contendo o diuron como parte da sua composição, tem colaborado com a crescente detecção desse químico em águas marinhas (Tabela 2), particularmente em áreas com intenso tráfego de embarcações, e em marinas e portos (THOMAS et al., 2000; BAO et al., 2011).

Tabela 2 – Concentrações máximas do biocida diuron encontrado em amostras de água do mar retiradas de portos e marinas de diversos países.

<b>Locais</b>	<b>Concentrações (ng/l)</b>	<b>Referências</b>
Espanha	2000	MARTÍNEZ et al. (2000)
Reino Unido	632	THOMAS et al. (2001)
Holanda	1130	LAMOREE et al. (2002)
Japão	350	HARINO et al. (2005)
Reino Unido	366	GATIDOU et al. (2007)
França	268	CAQUET et al. (2013)
Estados Unidos	68	SAPOZHNIKOVA et al. (2013)
Malásia	285	ALI et al. (2014)
Brasil	7,8	DINIZ et al (2014)
Coreia do Sul	1360	KIM et al. (2014)
Irã	390	SALEH et al. (2015)
Panamá	70	BATISTA-ANDRADE et al. (2016)

Fonte: O autor, 2017.

Estudos têm apontado que o diuron apresenta uma clara capacidade de desregulação endócrina, tanto para os organismos aquáticos, quanto para a saúde humana e, portanto, a avaliação dos seus níveis e efeitos no ambiente aquático têm sido de crescente importância nos últimos anos (LINTELMANN, 2003; PERINA, 2009). DELORENZO e FULTON (2012) apontam o diuron com um dos pesticidas mais tóxicos para algas marinhas. Essa afirmação é comprovada em diversos trabalhos (TEISSEIRE et al., 1999; EULLAFFROY, VERNET, 2003; CHESWORTH et al., 2004; MA et al., 2006; NEUWOEHNER et al., 2008; KHANAM et al., 2017; MANSANO et al., 2017). Não obstante, sua toxicidade também foi demonstrada em mudas de mangue. Um estudo realizado por Bell e Duke (2005), registrou que o diuron foi capaz de interferir no crescimento, e nos mecanismos de regulação de sal dessas plantas, além de ter sido o herbicida responsável pelos maiores níveis de mortalidade dentre os compostos testados.

O potencial para causar danos aos recifes de coral também tem sido motivo de grande preocupação (GAGNON, RAWSON, 2009). Algumas espécies de corais parecem ser sensíveis a esse herbicida quando expostos nos estágios iniciais de vida. Por meio de um experimento *in-vitro*, Sheikh e colaboradores (2009) expuseram larvas dos corais *Acropora millepora*, e *Pocillopora damicornis* ao diuron, a uma concentração de 300 ng/L. Diante

disso, os autores sugeriram que o biocida foi capaz de interferir na metamorfose das larvas de ambos os corais, e que a espécie *Pocillopora damicornis* foi extremamente suscetível a esse poluente, pois esses indivíduos sofreram branqueamento devido a expulsão de dinoflagelados simbiotes após exposição de 96 horas.

Esses dados, podem ser considerados alarmantes, pois os recifes de coral são ecossistemas marinhos de grande importância ecológica, econômica e social, e seu processo de vida é extremamente complexo, possuindo um alto grau de interdependência entre os organismos, o que reduz a elasticidade do ecossistema, tornando-o frágil e mais suscetível ao estresse e às mudanças do meio (RAY, 1987; MAIDA, FERREIRA, 1997; MIRANDA, et al., 2018).

#### 1.5.6 Fármacos

Os fármacos incluem medicamentos antrópicos e veterinários. Esses produtos chegam ao meio ambiente principalmente por meio da excreção humana, entretanto, o uso veterinário, tanto em grandes operações agrícolas, quanto na aquicultura, são outras vias de contaminação que também contribuem significativamente para o problema (WU, JANSSEN, 2011; TORRES et al., 2012).

A falta de infraestrutura de saneamento básico nas nações em desenvolvimento, colabora para a dispersão desses poluentes (REIS-FILHO, 2007), e torna o cenário ainda pior. No Brasil, por exemplo, um levantamento realizado pelo Sistema Nacional de Informação em Saneamento (SNIS, 2017) revelou que apenas cerca de 42,7% do esgoto gerado durante o ano de 2015 recebeu algum tipo de tratamento. Além disso, 30,5% dos municípios, lançam seus efluentes não tratados em rios, lagos ou lagoas, e utilizam estes mesmos corpos hídricos como fonte de abastecimento de água, recreação, irrigação e aquicultura (BRASIL, 2011).

A maioria dos fármacos são resistentes à biotransformação, propriedade atribuída propositalmente com o intuito de maximizar o período de tempo em que exercem efeito terapêutico, e assim, podem ser considerados ambientalmente persistentes (NUNES, 2011). As concentrações ambientais são geralmente várias ordens de magnitude abaixo das doses terapêuticas, mas com potencial riscos à saúde ambiental (LINDER, STAFFORD, 2001). Várias categorias de produtos farmacêuticos suscitam preocupações, entretanto as que são produzidas e consumidas em grandes quantidades, tais como as altamente potentes e as particularmente persistentes, são consideradas como as mais emergentes (WU, JANSSEN, 2011).

Nessas classes, dois produtos farmacêuticos podem ser destacados: 1) antibióticos como a eritromicina, a qual é amplamente utilizada na criação de frangos e gados; 2) os hormônios femininos sintéticos utilizados em contraceptivos orais como o 17 $\alpha$ -etinilestradiol (BRASIL, 2004). Os primeiros, devido ao desenvolvimento de bactérias resistentes e o segundo, pela potencialidade em afetar adversamente o sistema reprodutivo de organismos aquáticos (FICHER, FREITAS, 2011). Entretanto, há outros produtos que também requerem atenção, como os antineoplásicos e imunossupressores utilizados em quimioterapia, conhecidos como potentes agentes mutagênicos (BILA, DEZOTTI, 2003).

#### 1.5.6.1 Antibióticos

O uso intensivo de antibióticos nas últimas décadas, seja para fins humanos (doméstico e hospitalar) ou veterinários, contribuem para a chegada desses compostos no ambiente natural. Entretanto, as excreções provenientes da criação intensiva de animais (bovinos, suínos e aves) ou no caso da aquicultura a aplicação dessas substâncias na água para fins profiláticos, representam a principal forma de contaminação dos ecossistemas aquáticos (REGITANO, LEAL, 2010).

A presença de antibióticos em níveis de concentração ambientalmente relevantes, está associada a toxicidade crônica e ao aumento da resistência bacterianas a antibióticos (MICHAEL et al., 2013). Ainda que o desenvolvimento dessa resistência seja um fenômeno natural, existe uma clara correlação entre o agravamento desse processo, com o aumento mundial do consumo de antibióticos (WHO, 2005). Esse cenário é globalmente inquietante, pois existem cada vez mais bactérias resistentes a múltiplas drogas (particularmente em meio hospitalar), fato que dificulta a aplicação da terapêutica adequada, o que por vezes, gera um aumento das taxas de mortalidade por infecções, bem como dos custos inerentes às prestações dos cuidados de saúde (KLEVENS, 2007).

#### 1.5.6.2 hormônio sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol

O hormônio contraceptivo sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) é um estrógeno artificial, utilizado sobretudo, como principal composto em pílulas contraceptivas, sendo também bastante empregado para reposição hormonal por mulheres em tratamento da menopausa (sintomas vasomotores), além de ser indicado na prevenção do câncer de próstata (antineoplásico) e no combate a deficiência de estrogênio (NOTCH, 2007; POLI, 2009).

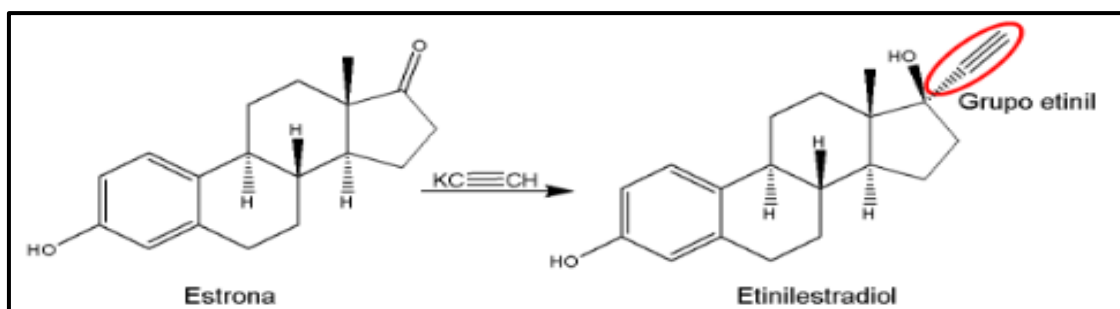


Apesar da sua importância como recurso terapêutico, o aumento da demanda por pílulas anticoncepcionais e de reposição hormonal tem gerado um constante alerta, pois a presença desse químico nos ambientes aquáticos e nas estações de tratamento vem sendo comumente detectada em grandes quantidades, e por sua vez, esse hormônio possui a capacidade comprovada de interferir nos processos de reprodução e desenvolvimento de diversos organismos (FERREIRA, 2008; SILVA, CONFORTI, 2013).

No tecido hepático humano, a excreção do EE2 é realizada por uma via oxidativa de hidroxilação realizada por enzimas da família dos citocromos P450 (CYP), especialmente as isoformas CYP 1A, 2B1, e 3A (NAVAS, SEGNER, 2001; HASSELBERG et al., 2004). Os metabólitos resultantes desta reação são, em seguida, processados por enzimas sulfotransferases (SULTs) e glucoroniltransferases (UGTs), durante o processo de biotransformação, que precede a eliminação da célula. Em muitos organismos enzimas homólogas às humanas atuam de forma equivalente (DANIELSON, 2002).

Embora grande parte dessa substância seja metabolizada e excretada na forma inativa conjugada, como glicuronídeos e sulfatos, a ação de enzimas produzidas por bactérias e por algumas espécies de microalgas como a *Raphidocelis subcapitata* comumente encontradas em áreas de despejo de efluentes, prontamente o biotransforma em compostos biologicamente ativos, este último é realizado por meio de processos de hidroxilação, reação catalisada pela monoxigenase do citocromo P450 (Cyt P450) para desintoxicação da espécie, e os tornando passíveis de desencadear efeitos deletérios em concentrações muito baixas na ordem de  $\mu\text{g L}^{-1}$  e  $\text{ng L}^{-1}$ , (PURDOM et al., 1994; BILA; DEZOTTI, 2007; LIU et al., 2018). Outro aspecto que também chama a atenção, é a adição do grupo etinil a sua composição (Figura 19), o que o torna pouco solúvel em água e bioresistentes a degradação (COMBALBERT, RAQUET, 2010).

Figura 19 – Síntese do 17 $\alpha$ -etinilestradiol a partir do estrogênio natural estrona.



Fonte: Adaptado de RAMÍREZ-SÁNCHEZ e colaboradores (2015).

Muitos métodos analíticos foram desenvolvidos para detectar e quantificar essa substância em matrizes ambientais como águas superficiais e subterrâneas, esgoto doméstico, efluentes de estação de tratamento de esgoto (ETE), sedimentos marinhos, solo e lodo biológico (BILA, DEZOTTI, 2007). Todavia, o conhecimento sobre a sua ocorrência em diferentes matrizes aquáticas ainda é limitado a um pequeno número de países, diante disso, dados sobre o seu comportamento, efeitos e destinação ainda são escassos (TORRES, 2009).

De acordo com Mello e colaboradores (2013), os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Paraná, Ceará, Rio Grande do Sul e Minas Gerais são os que realizaram os maiores quantitativos de pesquisas na área nos últimos anos, sendo o estado de São Paulo o que possui maior nível de investigação. A maioria desses estudos são focados na quantificação desse poluente em águas de abastecimento, e ainda há poucos dados relativos sobre estes compostos em corpos que recebam grandes volumes de esgotos como, por exemplo, a zona costeira (OLIVEIRA, 2015). No que tange as concentrações encontradas nas matrizes ambientais brasileiras (Tabela 3), essas mostram-se semelhantes ou muitas vezes até três ordens de grandeza superiores às concentrações comumente relatadas na literatura internacional (AQUINO et al., 2013).

Essas diferenças podem ser pertinentes a fatores culturais de consumo, como também pelas distintas técnicas empregadas na identificação e quantificação desse composto (VIALI, 2014). Sabe-se, porém, que mesmo em baixíssimas concentrações, o EE2 é capaz de desencadear diversos efeitos prejudiciais à biota aquática, como alterações nas taxas de fecundidade, modificações comportamentais, implicações histopatológicas, imunodepressão, modificação morfofisiológica sexual (imposex), entre outras irregularidades, e, apesar disso, ainda pouco se sabe sobre seus reais efeitos, particularmente em espécies de invertebrados (MANAHAN, 2003; LUNA, et al., 2014).

Tabela 3 – Máximas concentrações do hormônio sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol encontrado em diferentes matrizes e países.

<b>Matriz</b>	<b>País</b>	<b>Concentração ng/L</b>	<b>Referência</b>
Água superficial	Brasil	5000	GHISELLI, 2006
Água superficial	Brasil	4390	RAIMUNDO, 2007
Água superficial	Brasil	672,03	SODRÉ et al., 2007
Água superficial	Brasil	54	MIERZWA et al., 2009
Água superficial	Brasil	305	TORRES, 2009
Água superficial	Brasil	6.806	MONTAGNER e JARDIM, 2011
Água superficial	Brasil	672,3	OLIVEIRA, 2015
Água superficial	Brasil	206,55	SILVA, 2015
Água superficial	Brasil	283,56	NASCIMENTO, 2016
Esgoto Sanitário	Brasil	4830	GHISELLI, 2006
Esgoto Sanitário	Brasil	2.270	FROEHNER et al., 2010
Esgoto Sanitário	Brasil	4350	SOUZA, 2011
Esgoto Sanitário	Brasil	12,4	BRANDT, 2012
Esgoto Sanitário	Brasil	560	AQUINO et al., 2013
Sedimento	Brasil	129,75	FROEHNER et al., 2011
Água superficial	Holanda	4,3	BELFROID et al., 1999
Água superficial	Itália	0,04	BARONTI et al., 2000.
Água superficial	Alemanha	5,1	KUCH, 2001
Água superficial	França	3,2	CARGOUËT et al., 2011
Água superficial	EUA	4,7	ZUO et al., 2006
Água superficial	Itália	240	POJANA et al., 2007
Esgoto Sanitário	Alemanha	0,4	SPENGLER et al., 2001
Esgoto Sanitário	Itália	10	JOHNSON et al., 2000
Esgoto Sanitário	Alemanha	8,9	KUCH, 2001
Esgoto Sanitário	Holanda	7,5	BELFROID et al., 1999

Fonte: O autor, 2017.

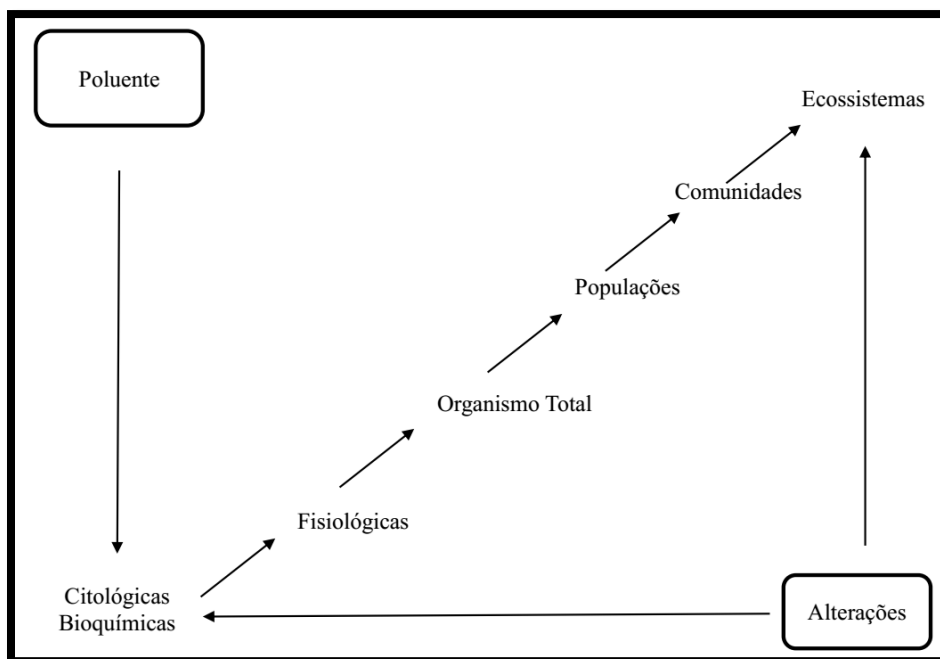
## 1.6 Biomonitoramento e Biomarcadores ambientais

O monitoramento dos DEs pode ser realizado por meio da quantificação *in situ*, ou por meio de indicadores biológicos, empregando-se, por exemplo, bioensaios *in vitro* e *in vivo* (KUSTER et al., 2010; PIMENTEL, 2013). Contudo, os resultados das análises que buscam determinar somente as suas concentrações, podem não retratar por completo o real impacto ambiental causado por esses compostos, já que este tipo de metodologia não evidencia seus possíveis efeitos sobre os organismos biológicos (MAGALHÃES, FILHO, 2008). Dessa maneira, é crescente a demanda global por programas de biomonitoramento que utilizem bioensaios como forma de medir os danos causados pelos DEs aos organismos aquáticos (ROSENBERG, RESH, 1993; BILA, DEZOTTI, 2007).

Cabe ressaltar que, pelo fato de não considerarem uma série de complexas interações que ocorrem nos ambientes naturais, o bioensaio também possui fatores limitantes, entretanto, paralelo ao oposto, as condições controladas, quase sempre apresentam uma visão conjuntural sobre os efeitos agudos e crônicos provocados pelos contaminantes nos organismos, dado que o agente causador é, em geral, de conhecimento do pesquisador (CAIRNS, PRATT, 1989; CARMAN et al., 1995; BILA, DEZOTTI, 2007). Os testes ecotoxicológicos, ou bioensaios, têm se tornado bastante comuns nos últimos anos no Brasil, pois a adoção de organismos sentinelas, pode elucidar os efeitos toxicológicos de substâncias exógenas, possibilitando avaliar e caracterizar o estado de saúde ambiental dos ecossistemas, produzindo dados confiáveis, que permitam definir medidas adequadas para sua proteção e/ou recuperação (PHILLIPS, RAINBOW, 1993; FERNANDEZ et al., 2002; MAGALHÃES, FILHO, 2008).

Sob tal enfoque, as alterações decorrentes da exposição a um poluente apresentam maior frequência em nível celular do que em níveis de alta organização biológica, como reprodutivos e comportamentais (VAN DER OOST et al., 2003). Portanto, antes de atingir as camadas superiores de organização biológica, como comunidades e ecossistemas, os efeitos dos contaminantes podem ser verificados em classes inferiores de organização biológica (Figura 20), (JONSSON, CASTRO, 2005; ARIAS et al., 2007). Consequentemente, as técnicas que evidenciem respostas em categorias mais baixas de disposição biológica são mais preventivas (ZAGATTO, BERTOLETTI, 2006).

Figura 20 – Hierarquia biológica e respostas a poluentes.



Fonte: ZAGATTO e BERTOLETTI (2006).

Nesse contexto, é crescente o uso de biomarcadores (alterações biológicas que expressam a exposição e/ou o efeito tóxico de poluentes presentes no ambiente por meio do conjunto de reações) como forma de abordagem na compreensão dos mecanismos capazes de induzir uma reação do indivíduo, população ou comunidade frente a uma perturbação (ARMITAGE, 1995; WALKER et al., 1996; BUSS, et al., 2003; OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2005). Uma perturbação pode ser gerada, por um processo pelo qual um distúrbio de uma determinada magnitude provoca uma resposta em termos de densidades ou composição a uma espécie, população ou comunidade (GLASBY, UNDERWOOD, 1996). No entanto, para que ocorra a perturbação esse distúrbio deve ser grande o suficiente para superar a inércia de uma população em uma assembleia, e induzir alterações quantitativas e/ou qualitativas na estrutura e funcionalidade das comunidades (UNDERWOOD, 1989).

Exemplos de biomarcadores incluem a indução de expressão gênica e subsequente tradução de RNA mensageiro e síntese de novas proteínas, e estes podem ser utilizados para caracterizar genes específicos envolvidos em doenças e fatores de estresse (WALKER et al., 1996; LOUIS, et al., 2016; WANG et al., 2018). De modo geral, a presença de um contaminante atua como um agente que ativa um sensor ou receptor celular, que por sua vez interage com uma sequência específica de DNA no núcleo promovendo a transcrição de algum gene. O produto da transcrição é o RNA mensageiro (RNAm), que é processado e

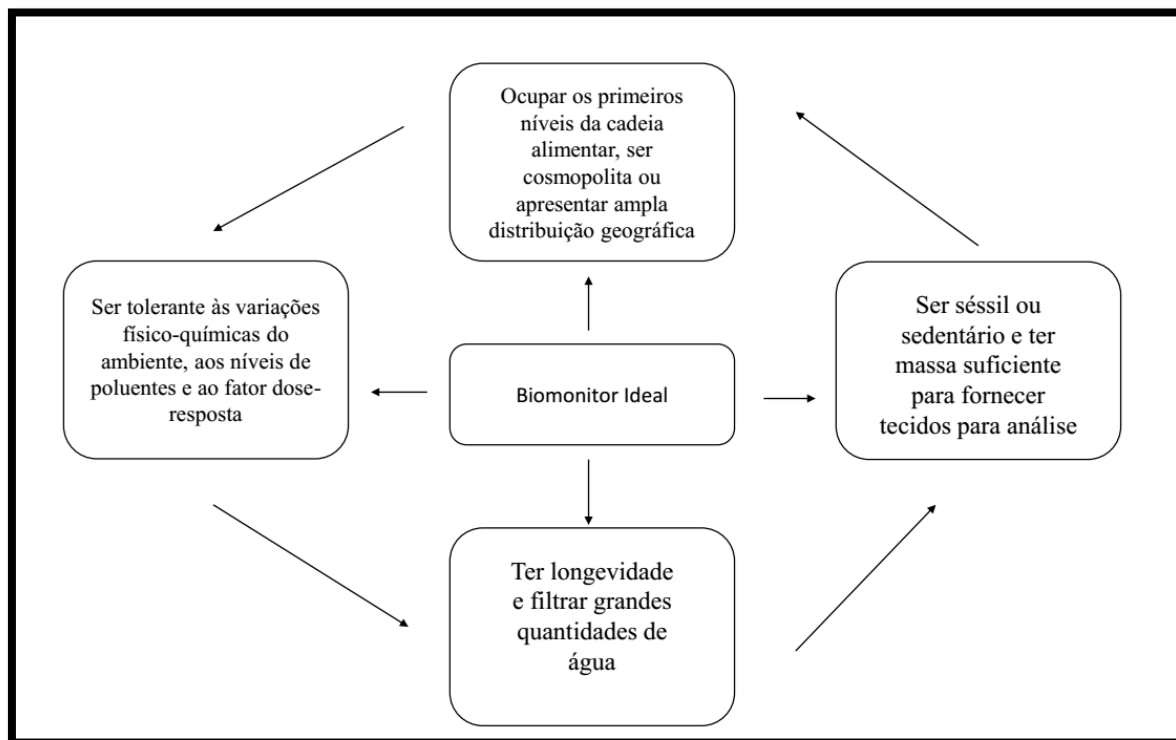
enviado ao citoplasma para que o ribossomo sintetize a proteína correspondente. A proteína, por sua vez, constitui a base molecular da resposta biológica à presença do agente (PIÑA et al., 2007). Assim, a expressão gênica representa o primeiro nível de interação entre um agente estressor e o genoma, que, por meio da síntese de proteínas dirige a resposta do organismo às mudanças externas (BRULLE et al., 2008).

A exposição dos organismos a compostos tóxicos pode provocar um aumento ou uma diminuição da expressão gênica, de modo diferencial para cada composto, em função de suas características químicas e interações com os receptores celulares. Conseqüentemente, um crescente número de estudos tem demonstrado que a expressão diferencial de genes pode ser utilizada na análise toxicológica preditiva, auxiliando na identificação da classe de toxicidade de determinado composto (JENNY et al., 2002; MAGGIOLI et al., 2006).

Presumindo que os genes diferencialmente expressos derivem da exposição das esponjas ao hormônio  $17\alpha$ -etinilestradiol, com o auxílio da padronização dos bioensaios e da extração do RNA talvez seja plausível, que se possa identificar fragmentos de genes relacionados a respostas desses organismos a alguns DEs. Assim, os programas de biomonitoramento que visam avaliar impactos ou riscos provenientes do aporte de DEs nos ambientes marinhos podem ganhar um importante reforço na utilização desse tipo de biomarcador, complementando o rol de análises químicas que garantem o melhor diagnóstico do ambiente estudado, fornecendo informações sobre regiões que necessitam de maior fiscalização (ou proteção) e avaliar o quanto os instrumentos de conservação estão produzindo resultados positivos (MELO, HEPP, 2008; COIMBRA et al., 2013).

Por outro lado, nesse contexto, Phillips e Rainbow (1993), destacam que para um organismo ser considerado como biomonitor ideal, ele deve possuir as características descritas na Figura 21.

Figura 21 – Representação esquemática das principais características de um biomonitor ideal baseado em PHILLIPS e RAINBOW (1993).



Dessa forma, por apresentar todos esses atributos, as esponjas marinhas (Filo Porifera) podem ser utilizadas como biomonitoras de poluição. Os Poríferos são animais aquáticos sésseis, em sua maioria marinhos, esses organismos possuem uma variedade de formas, tamanhos e cores, mas compartilham uma estrutura corporal relativamente simples, formando uma organização celular, mas sem o desenvolvimento de tecidos verdadeiros e nem órgãos. Inúmeros poros superficiais minúsculos, ou óstios, permitem que a água entre e circule por meio de uma série de canais onde o plâncton e partículas orgânicas são filtrados e ingeridos. Essa rede de canais e um esqueleto relativamente flexível dão à maioria desses organismos uma textura esponjosa (MICHAEL, HUBER, 2012).

Concomitantemente são os mais antigos organismos pluricelulares vivos, e surgiram a pelo menos 550 milhões de anos, e muito embora sejam considerados organismos simples ou primitivos, as esponjas são animais bastante evoluídos, já que se adaptaram e sobrevivem por mais tempo do que qualquer outro animal pluricelular, sendo que no ambiente marinho elas coexistem e interagem com uma variedade de outros organismos (MURICY, SILVA, 1999; MOTHEs et al., 2003). Além disso, as esponjas possuem um grande valor para a economia ambiental, pois apresentam uma série de metabólitos secundários de grande interesse farmacológico e biomédico (MEHBUB et al., 2014).

Paralelo ao exposto, por serem animais sésseis e filtradores, são influenciados pela qualidade da água, notadamente por partículas orgânicas e minerais, como também por poluentes e materiais orgânicos dissolvidos, tornando-os eficientes biomonitoradores de poluição doméstica e industrial (ALCOLADO, 2007). Esses organismos produzem respostas fisiológicas, metabólicas e moleculares que atuam como um primeiro alerta do efeito de poluentes ou de alterações de fatores físicos, possibilitando uma reação rápida para evitar ou diminuir o impacto do dano no ambiente (BÖHM et al., 2000).

Por exemplo, o filo Porifera possui moléculas homólogas às do sistema imune inato e adaptativo dos animais mais complexos, como a família de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK, do inglês *Mitogen Activated Protein Kinases*; BÖHM et al., 2000; MÜLLER et al., 2001). Kurelec e colaboradores (1992) estabeleceram que as células de esponjas são também equipadas com um mecanismo de multirresistência à drogas (MDR, do inglês *multidrug resistance*), com capacidade de diminuir o acúmulo de drogas, através de uma síntese aumentada do sistema de bomba de glicoproteína transmembrana P-170 (liga drogas e facilita seu efluxo das células). Spataro e colaboradores (1997) demonstraram que, em vertebrados, além do mecanismo de extrusão P-170, existe um segundo sistema de resistência pleiotrópica mediada por uma peptidilarginina deiminase (PAD, do inglês *peptidylarginine deiminase*), cujo gene correspondente em humanos foi denominado *pad one homologue* (POH1). Um estudo publicado em 2001, por Krasko e colaboradores, revelou a existência de uma enzima proteolítica *pad one homologue* (POH1) na demosponja *Geodia cydonium*. Os autores sugerem que a proteólise esteja envolvida na inativação de xenobióticos pelo sistema POH1, que é capaz de resistir a múltiplos fármacos, inativando xenobióticos, sendo este um marcador adicional para a avaliação da carga ambiental em determinada área.

Por isso, a padronização de bioensaios para o levantamento de respostas biológicas e fisiológicas como as expressas pelas esponjas marinhas, em escala individual, podem gerar, em uma curta escala de tempo, informações relevantes sobre o potencial efeito de poluentes como os desreguladores endócrinos, além de oferecerem uma grande vantagem ecológica e econômica no monitoramento dos corpos hídricos, complementando a percepção dos parâmetros físicos e químicos nos locais de estudo. (LYONS et al., 2003; PEREZ, 2003; FERRANTE et al., 2018).

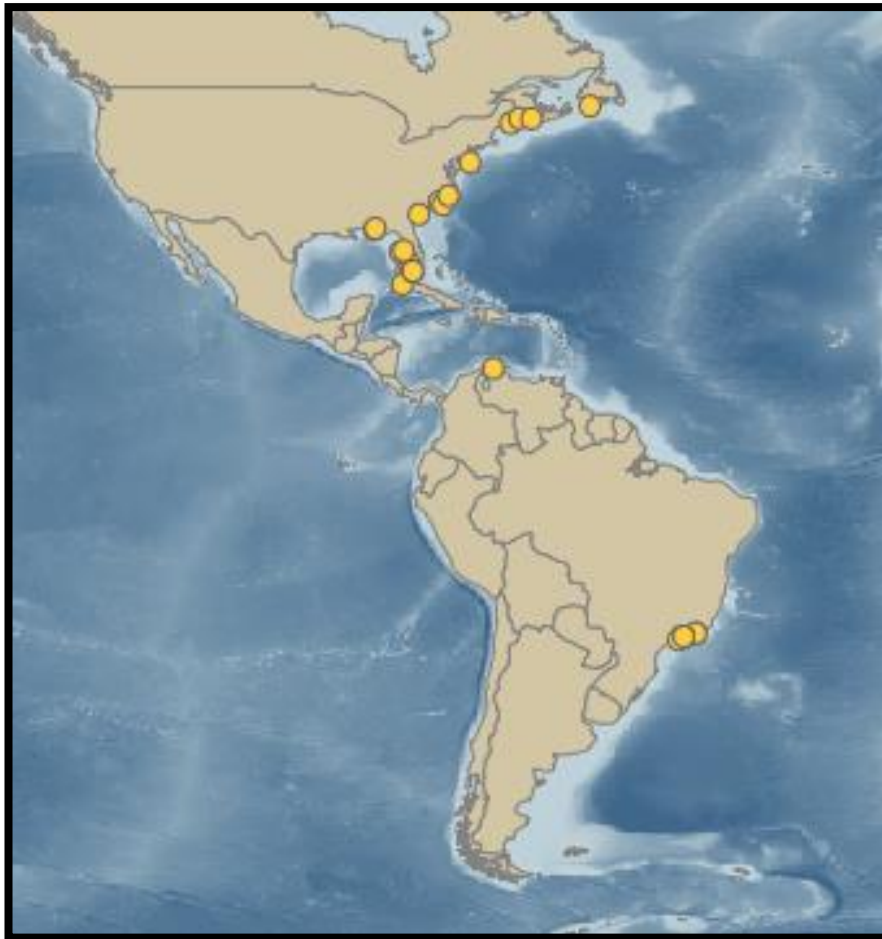
Dentre as espécies de esponjas empregadas em bioensaios a esponja marinha *Hymeniacidon heliophila* (Wilson, 1911) (Porifera: Heteroscleromorpha: Suberitida: Halichondriidae)(VAN SOEST et al., 2019), tem sido comumente utilizada como biomonitora de poluição (SERENO, 2011; BATISTA et al., 2013; FRAZÃO, 2013; PEDRETE, 2013;



PEDRETE et al., 2017). Essa é uma espécie apresenta hábitos generalistas e consegue habitar ambientes poluídos como baías e áreas portuárias, são comumente encontradas em locais antropizados (MURICY, HADJU, 2006).

Na literatura, à utilização dessa espécie como biomonitora de poluição, pode ser descrita por Frazão (2013), o autor demonstrou que esse organismo possui alta capacidade em acumular metais, e uma grande eficiência de induzir respostas histológicas quando exposta a esse tipo de contaminante. Concomitantemente, Batista (2010) observou altas concentrações de metais nesta espécie em diferentes regiões da Baía de Guanabara – RJ. A esponja marinha *Hymeniacidon heliophila* (Wilson, 1911) (Porifera: Halichondrida) está presente no oceano Atlântico tropical ocidental (figura 22).

Figura 22 – Mapa da Distribuição da *Hymeniacidon heliophila* (Wilson, 1911).



Fonte: Adaptado de: <http://www.marinespecies.org/porifera/index.php>

No Brasil essa espécie é encontrada restrita as regiões Sul e Sudeste, desde a zona entre marés até uma profundidade de 15 metros, onde estão frequentemente associadas a interface entre fundos rochosos e arenosos, e ao substrato consolidado (BREVES-RAMOS et

al., 2005; MURICY, HAJDU, 2006). É uma esponja de coloração amarela e laranja clara (Figura 23) que apresenta projeções em forma de vulcão onde estão os ósculos (MOTHES et al., 2003).

Figura 23 – *Hymeniacidon heliophila* (Wilson, 1911).



Foto: O autor, 2017.

Apesar do amplo uso de bioensaios animais e vegetais na literatura, são escassas as publicações que utilizem esponjas nesse tipo de ensaio, os diversos protocolos encontrados na literatura para outros organismos poderiam fornecer diferentes resultados em função de variações metodológicas aplicadas e nem sempre em resposta aos tratamentos utilizados. Portanto, estudos com o objetivo de estabelecer protocolos ecotoxicológicos para que possam ser rotineiramente utilizados em laboratórios, são de extrema importância.

Em relação ao hormônio sintético  $17\alpha$ -etinilestradiol, até o desenvolvimento final do presente trabalho, não foi encontrada nenhuma bibliografia descrevendo a padronização de bioensaios, bem como a extração do RNA da espécie de interesse. Sob tal enfoque, o presente trabalho teve como objetivo a elaboração de um protocolo competente e reproduzível de bioensaios e de extração do RNA da esponja marinha *Hymeniacidon heliophila* (Wilson, 1911) (Porifera: Halichondrida).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Estabelecer um protocolo de bioensaios e de extração de RNA utilizando a esponja marinha *Hymeniacidon heliophila* (Wilson, 1911) (Filo Porifera) como possível biomonitor de poluição do desregulador endócrino 17 $\alpha$ -etinilestradiol.

### 2.2 Objetivos específicos

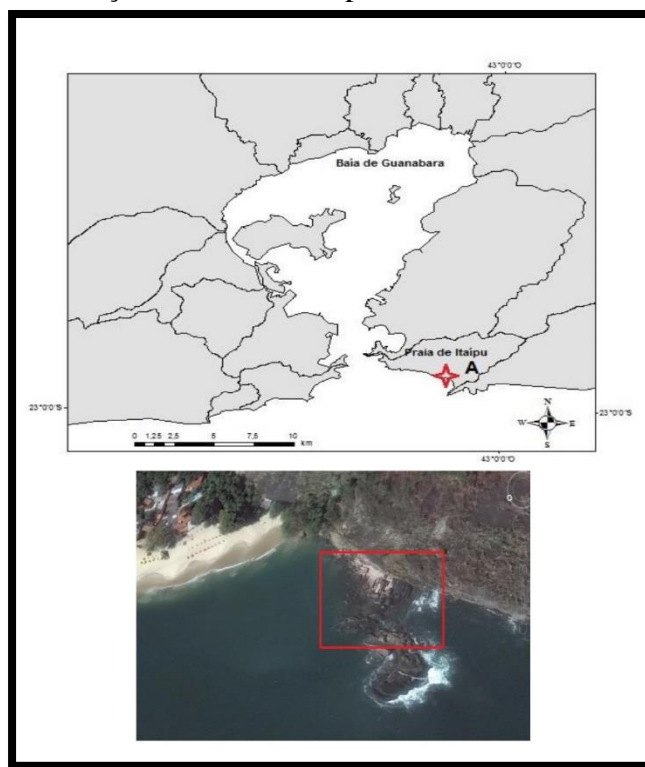
- Padronizar bioensaios de exposição da esponja *Hymeniacidon heliophila* (Wilson, 1911) (Filo Porifera) ao estrogênio contraceptivo sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol;
- Estabelecer a técnica de extração de RNA mensageiro total na esponja marinha *Hymeniacidon heliophila* (Wilson, 1911) (Filo Porifera).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Descrição do local de coleta das esponjas

Esponjas marinhas da espécie *Hymeniacidon heliophila* (Wilson, 1911) foram coletadas na região do costão rochoso da praia de Itaipu, Niterói-RJ,  $22^{\circ}58'27.73''\text{S}/ 43^{\circ}2'50.16''\text{W}$  (Figura 24). O local foi escolhido devido a facilidade de acesso e grande abundância da espécie na área. As coletas foram feitas em três campanhas: julho de 2016; fevereiro de 2017, e novembro de 2017).

Figura 24 – Mapa de localização das coletas de poríferos.



Legenda: Mapa da Baía da Guanabara mostrando a localização da Praia de Itaipu. Em destaque o ponto de coleta no costão rochoso do lado esquerdo da Praia de Itaipu.

Fonte: O autor, 2017.

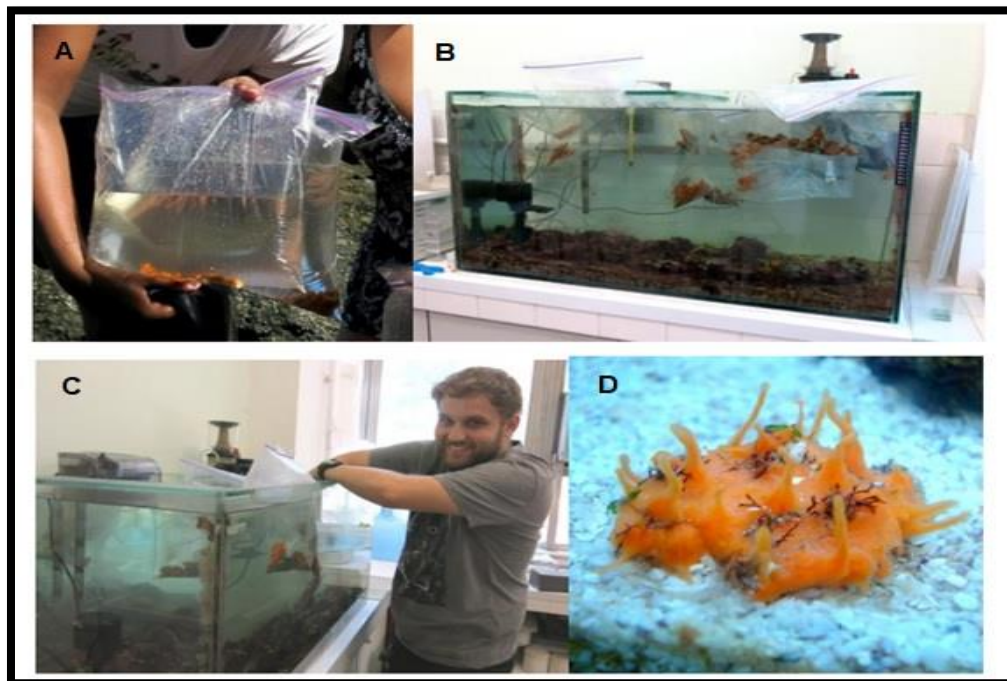
A praia de Itaipu ( $22^{\circ} 53' \text{ S}$ ,  $43^{\circ} 22' \text{ W}$ ) é formada pelo volume de água decorrente da mistura das águas da Baía da Guanabara, do sistema lagunar Itaipu-Piratininga e das massas de águas oceânicas afetadas pelas correntes do Atlântico Sul (TUBINO et al., 2007). Com cerca de 800 metros de extensão, apresenta orientação aproximada norte-sul, e está localizada no extremo leste da enseada de Itaipu, do litoral de Niterói, caracterizado por uma maré do tipo mista, semidiurna, sendo as ondas o principal agente modelador desta costa, juntamente

com as correntes de deriva litorânea e de retorno (RODRIGUES, 2014). O local é diretamente afetado por grande quantidade de resíduos sólidos provenientes das atividades de lazer, e por estar diretamente conectada à Baía de Guanabara (COSTA, 2011).

### 3.2 Procedimento de coleta das esponjas

Um total de 15 esponjas foram coletadas em cada campanha com o auxílio de facas e espátulas, sendo os indivíduos retirados do costão rochoso vivos e inteiros, sempre submersos em água marinha, e acondicionados em sacos plásticos transparentes com mínima diferença de volume, contendo água do próprio local de coleta, onde permaneceram até serem aclimatadas em aquário marinho de 200 litros previamente disposto no Laboratório de Genética Marinha - LGMar, na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), campus Maracanã, localizado no município do Rio de Janeiro/RJ (Figura 25).

Figura 25 – Coleta e transporte da *Hymeniacidon heliophila* (Wilson, 1911) e aquário marinho no Laboratório de Genética Marinha para aclimação e manutenção das esponjas.



Legenda: A. saco plástico contendo *Hymeniacidon* coletada. B. aquário com vários sacos plásticos com esponjas aclimatando. C. autor removendo as esponjas dos sacos plásticos e colocando no substrato do aquário. D. *Hymeniacidon heliophila* no aquário.

Fotos: Gisele Lôbo-Hajdu, 2017.

### 3.3 Preparo das soluções de exposição

As soluções nas concentrações iniciais desejadas para o experimento foram preparadas a partir da solução estoque, obtida do padrão de 17 $\alpha$ -etinilestradiol grau analítico (pureza > 98% *Sigma-Aldrich*). Devido à baixa solubilidade em água do hormônio EE2, a sua solução estoque foi previamente preparada por meio da dissolução do soluto em álcool etílico (pureza >99,9% *pa emsure Merck™*) conforme preconização do fabricante.

### 3.4 Desenho Amostral

O número amostral foi baseado na equação dos recursos, este método matemático, proposto por Mead (1988), pode ser utilizado para pequenas e complexas experiências biológicas que envolvem vários grupos de tratamentos. A equação implica que o experimento deve ter dimensão apropriada se os graus de liberdade de erro em uma análise de variância estiverem entre 10 e 20. De forma simplificada a equação pode ser descrita como:

$$E = N - T + 1$$

E (tamanho da amostra);

N (número de animais por tratamento x número de tratamentos);

T (Número de tratamentos).

Neste trabalho utilizou-se duas abordagens para a padronização dos bioensaios, aqui denominados de Bioensaios I e Bioensaios II.



### 3.5 BIOENSAIOS I

#### 3.5.1 Manutenção e Aclimatização das amostras coletadas

Realizada a coleta, as esponjas foram aclimatadas por cinco dias em aquário marinho de 200 litros - Figura 26. Para o cultivo e manutenção dos organismos-teste em laboratório, foram consideradas algumas condições físicas e químicas tais como: fotoperíodo 12h/12h, esse controle foi realizado automaticamente por um timer instalado junto ao sistema de iluminação artificial por meio de duas lâmpadas uma fluorescentes de 20 Watts e uma tipo *Coral Blue Life* de 20 Watts.

Figura 26 – Aquário marinho para aclimatização e manutenção das esponjas.



Fonte: O autor, 2017

A temperatura da água variou entre 23°C e 25°C obtida por meio de aparelho de ar condicionado do laboratório, e monitorada mediante um termômetro de mercúrio instalado no aquário. O teor de amônia menor que 0,25 ppm medido com kit para amônia tóxica (água salgada) – fabricante - Labcon Test. A filtração mecânica foi promovida por meio de filtro biológico para retenção de sólidos grosseiros e circulação constante por bomba submersa (*SarloBetter* 2000 L/h), associada à *Protein Skimmer* (Boyu DT-2516). O pH e a concentração de nitratos foram acompanhados utilizando-se kits comerciais, *Sera™* e *Tetra teste™*,

respectivamente. Semanalmente, 5% da água do aquário era renovada com água marinha artificial 31ppt e monitorada com um hidrômetro simples.

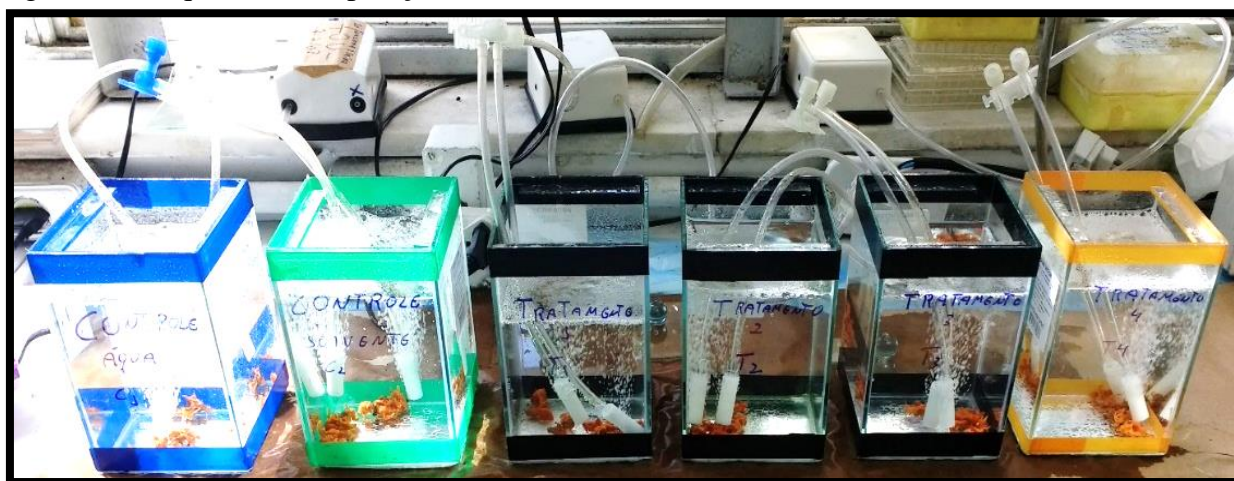
Posteriormente ao período de aclimação, as esponjas foram retiradas do aquário submersas em água do próprio cultivo, e em seguida segmentadas em pedaços de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup>, valor preconizado no kit de extração Direct-zol RNA Plus™ (Sinapse) para obtenção de tecido suficiente à extração do RNA, e novamente mantidas em aquário marinho por sete dias até a completa regeneração tecidual e execução dos experimentos.

Sinais que pudessem evidenciar estresse aos organismos, como descoloração e liberação de muco, foram avaliadas. Animais que apresentaram esses sintomas foram descartados e excluídos dos ensaios.

### 3.5.2 Montagem do experimento

Para a realização dos bioensaios, montou-se seis aquários tipo “beteira” com capacidade de um litro cada, medindo 10 x 10 x 15 cm, mantidos sob aeração constante por meio de um sistema de pedras porosas acopladas a três compressores - bomba aeradora. (Figura 27).

Figura 27 – Aquários de exposição ao hormônio sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol.



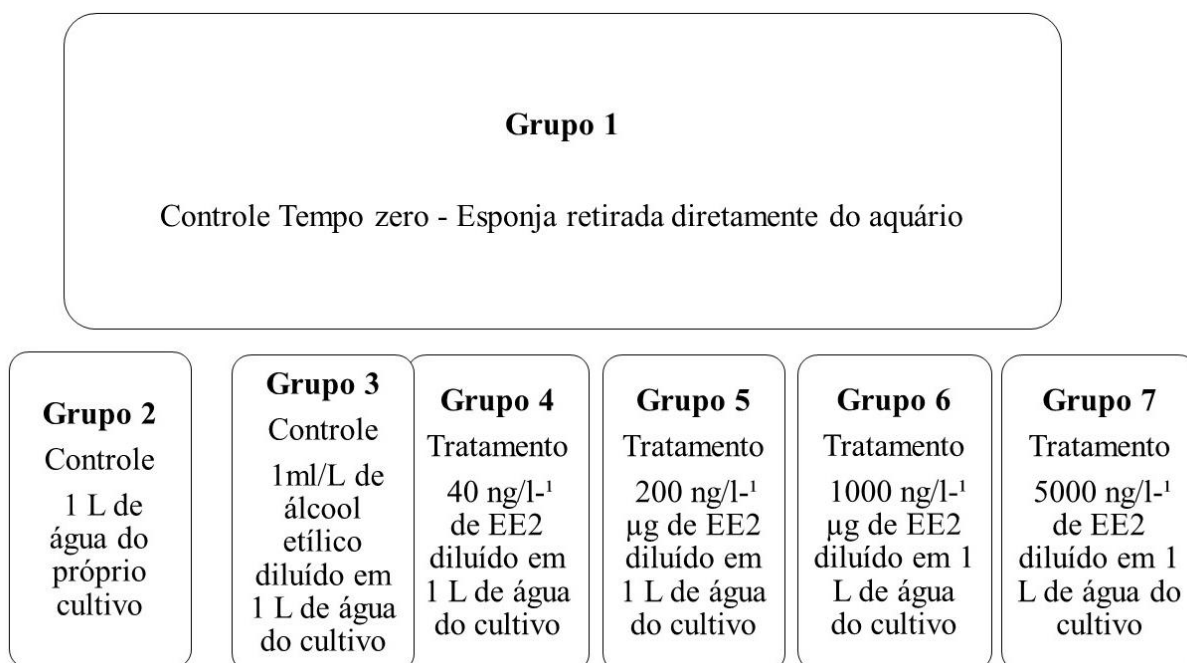
Fonte: O autor, 2017.

Para realização dos testes de toxicidade, separou-se as esponjas em sete grupos distintos – Figura 28: 1) controle tempo zero - amostras de esponja (três pedaços) retirados diretamente do aquário antes do experimento, fixadas em RNAlater™ e em seguida



armazenadas no freezer à  $-80^{\circ}\text{C}$  até a extração do RNA; 2) controle água – contendo 1L de água do próprio cultivo; 3) controle solvente - com a mesma quantidade de álcool etílico (pureza  $>99,9\%$  *pa emsure* Merck<sup>TM</sup>) utilizado como solvente do estrógeno dissolvido em 1L de água do próprio cultivo; 4) tratamentos I; 5) tratamento II; 6) tratamento III e 7) tratamento IV, com o hormônio nas seguintes concentrações: 40; 200; 1000 e 5000  $\text{ng/l}^{-1}$ , respectivamente, dissolvido em 1L de água do próprio cultivo. Este gradiente de concentrações foi escolhido fazendo-se uma média de valores observadas em matrizes brasileiras mencionados na tabela 3.

Figura 28 – Esquema dos bioensaios I com os diferentes grupos a serem analisados.



Para avaliar os efeitos agudos e crônicos de exposição aos poluentes, os organismos - teste permaneceram expostos nos seguintes tempos: 10 min; 40 min; 120 min; 6 h e 24 h. Três pedaços de esponjas eram retirados de cada grupo nos tempos estabelecidos, totalizando três amostras por ocasião. Em seguida as amostras foram fixadas em RNAlater<sup>TM</sup> e armazenadas no freezer à  $-80^{\circ}\text{C}$  até a extração do RNA.

### 3.5.3 Extração do RNA e quantificação das amostras

Com o objetivo de estabelecer um protocolo para extração do RNA total das esponjas, somente as seguintes amostras foram selecionadas: Controle água dez minutos (CA10); Controle Solvente dez minutos (SOL10); Controle -Tempo zero (T0); Tratamentos I; II; III e IV - dez minutos – (T1); (T2); (T3) e (T4), respectivamente. As extrações foram realizadas adotando-se dois procedimentos: Método do *Trizol* (Invitrogen®) e Kit de extração Direct-zol RNA Plus™ (Sinapse). As duas abordagens foram empregues, afim de se testar diferentes protocolos de extração do RNA total para espécie escolhida e assim escolher o mais adequado para as extrações restantes.

Para a checagem do grau de integridade do RNA, as extrações foram submetidas à separação por eletroforese em gel desnaturante de agarose 1%, contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo, em tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1X, por 1 hora, a 80 V. Após a separação, os géis foram colocados em um transiluminador e fotografados no próprio sistema. Todo o material necessário para a extração foi devidamente autoclavado e previamente descontaminado por meio de solução dodecil sulfato de sódio - SDS 0,5%.

## 3.6 BIOENSAIOS II

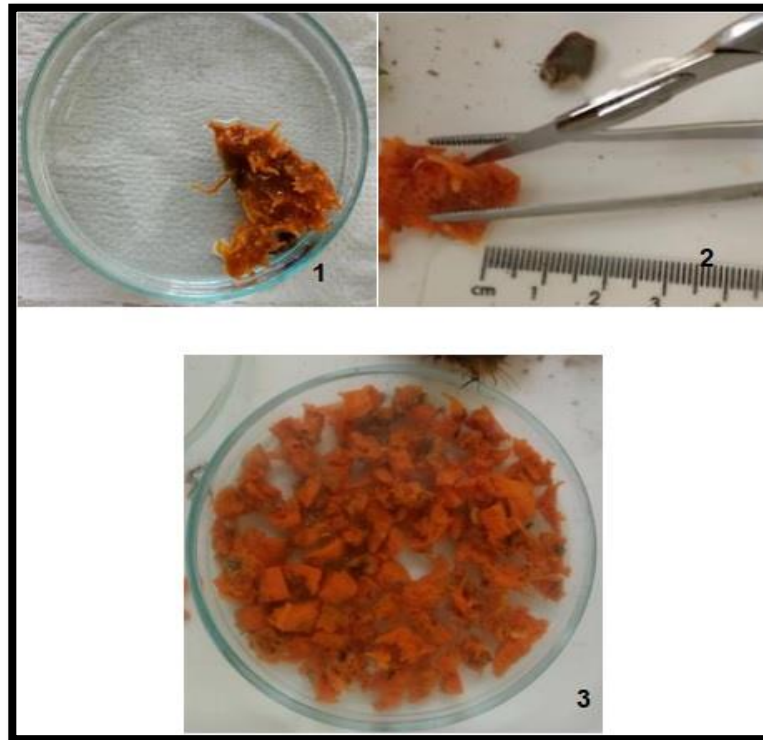
### 3.6.1 Manutenção e Aclimatização das amostras coletadas

Toda a metodologia de coleta e aclimatização das esponjas seguiram os mesmos procedimentos dos biosensaios I, porém para o bioensaio II as esponjas permaneceram aclimatadas durante 28 dias.

### 3.6.2 Montagem do experimento

Posteriormente ao período de aclimatação, três indivíduos grandes de esponjas foram retirados do aquário submersos em água do próprio cultivo, e em seguida segmentados (Figura 29) em um total de 57 pedaços de aproximadamente um 0,5 cm<sup>2</sup> cada, valor preconizado no kit de extração Direct-zol RNA Plus™ (*Sinapse*) para obtenção de tecido suficiente à extração do RNA. Os pedaços foram colocados em tubos cônicos de polipropileno de 50 ml, do tipo ‘Falcon™’, em constante aeração por meio de um sistema de pedras porosas acopladas a três compressores (bomba aeradora) até a execução do experimento. A adoção dos tubos tipo ‘Falcon™’ foi escolhida, para avaliarmos as diferentes variáveis e sua influência na degradação do RNA total.

Figura 29 – Processo de segmentação das esponjas.

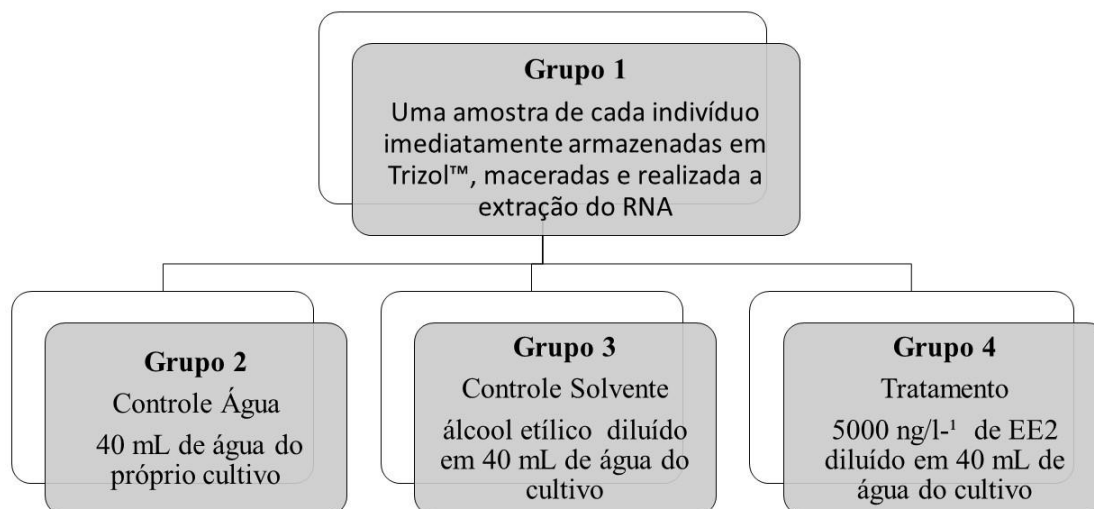


Legenda: (1) esponja sendo preparada para o corte; (2) procedimento de segmentação dos organismos; (3) esponjas segmentadas.

Fonte: O autor, 2017.

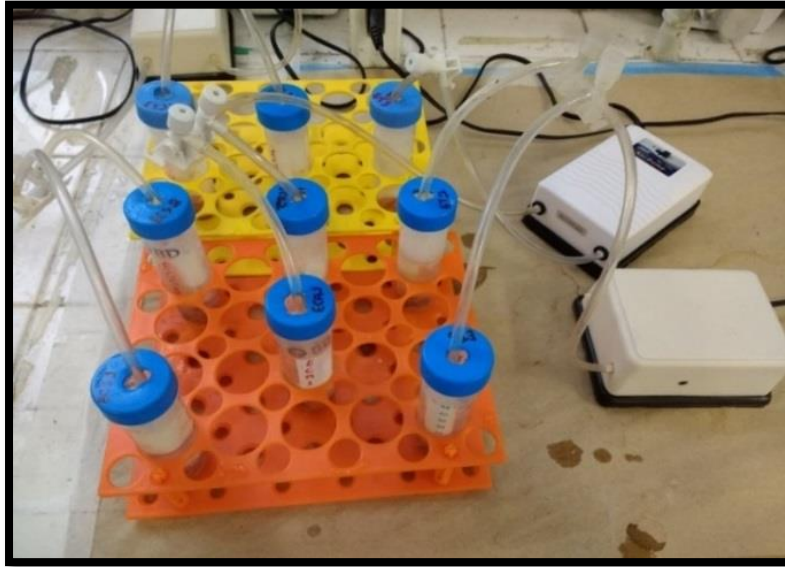
Para realização dos testes de toxicidade, separou-se as esponjas em quatro grupos distintos Figura 30 – 1) controle tempo zero – Uma amostra de cada indivíduo, imediatamente armazenadas em Trizol™, maceradas e realizada a extração do RNA; 2) controle água - contendo 40 ml de água do próprio cultivo; 3) controle solvente - com a mesma quantidade de álcool etílico (pureza >99,9% *pa emsure* Merck™) utilizado como solvente do estrógeno dissolvidos em 40 ml de água do próprio cultivo; 4) tratamento com o hormônio na concentrações de 5000 ng/L<sup>-1</sup> dissolvido em 40 ml de água do próprio cultivo, essa concentração foi baseada em uma média dos valores máximos encontrados em diversas matrizes aquáticas no Brasil (Tabela 3).

Figura 30 – Esquema dos bioensaios II com os diferentes grupos a serem analisados.



Os ensaios foram mantidos nos seguintes tempos de exposição: 40 e 120 minutos – Figura - 31. Três pedaços de esponjas eram retirados de cada grupo nos tempos estabelecidos, totalizando nove amostras por indivíduo em cada ocasião. Em seguida as amostras eram fixadas em Trizol™, imediatamente maceradas e acondicionadas em gelo para a imediata extração do RNA. Foi necessária a adoção de apenas uma concentração do hormônio, tal qual a redução dos tempos a serem realizados no experimento, pois nessa metodologia optou-se pela imediata extração do RNA para minimizar os riscos de degradação do mesmo.

Figura 31 – Ensaio de exposição da esponja ao hormônio sintético  $17\alpha$ -etinilestradiol.

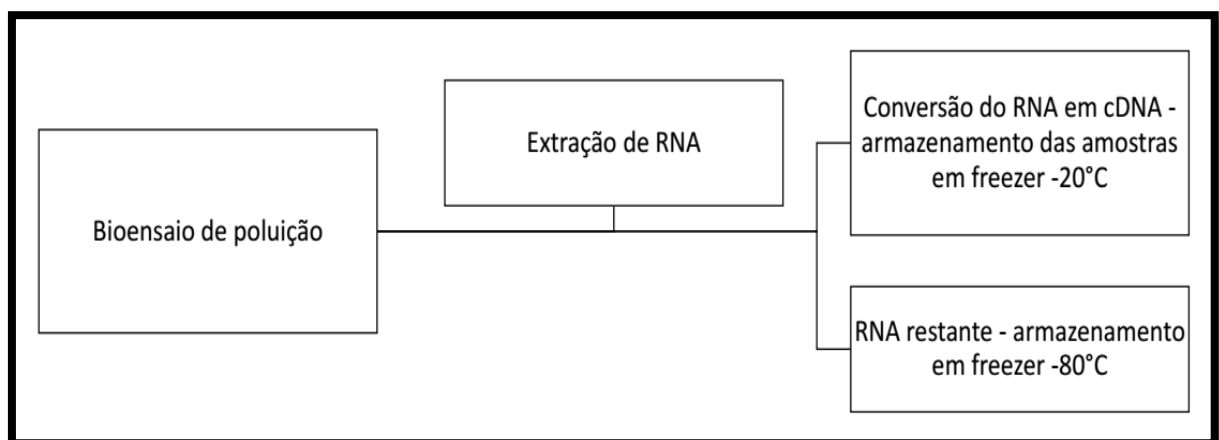


Fonte: O autor, 2017

### 3.6.3 Extração do RNA e quantificação das amostras

A extração do RNA total foi realizada imediatamente logo após os tempos estabelecidos no experimento, para isso utilizou-se de kits de extração Direct-zol RNA Plus™ (Sinapse), sendo todo o procedimento efetuado em gelo seco triturado para a manutenção e preservação do RNA. O RNA extraído, foi imediatamente convertido a cDNA (DNA complementar) por meio do Kit - GoScript™ Reverse Transcriptase, e as amostras de cDNA armazenadas em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ , e o RNA restante estocado em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  (Figura 32).

Figura 32 – Síntese das principais etapas realizadas durante o experimento.



Fonte: O autor, 2017.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Padronização dos ensaios de exposição ao estrogênio sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol

A espécie apresentou um ótimo desempenho para sua manutenção em laboratório, além do que na condução dos experimentos nesse trabalho, as duas condições de bioensaios analisadas se mostraram bastante satisfatórias, pois não houve sinais de estresse nos organismos durante seu manuseio para realização dos testes de toxicidade. Alguns autores como Frazão (2013) corroboram com essa afirmação, pois em seu experimento utilizando a *Hymeniacidon heliophila* como biomonitora de metais, a espécie se mostrou bastante resistente no transporte e manutenção no laboratório, como também nos experimentos utilizando aquários como bioensaios. Essas características também vão de encontro com o trabalho de Sereno (2011), onde a autora expos a esponja marinha *H. heliophila* ao lipopolissacarídeo de *E. coli* em diferentes tempos utilizando tubos tipo “Falcon™”. A autora sugere que a espécie foi adequada para a realização desse tipo de ensaios ecotoxicológicos.

A padronização das condições de manutenção em laboratório da esponja marinha *Hymeniacidon heliophila* e a determinação de um controle positivo de efeito conhecido de diferentes bioensaios para a espécie são alguns dos vários fatores a serem alcançados para estabelecer este organismo como um modelo animal reconhecido. O presente estudo conseguiu avançar na padronização deste modelo animal, identificando sua tolerância aos diferentes tipos de bioensaios e permitiu reconhecer, por meio das diferentes metodologias, suas limitações para preservação do RNA total. É importante esclarecer que os bioensaios, cuja padronização é proposta neste trabalho, não avaliaram os efeitos do hormônio 17 $\alpha$ -etinilestradio, em relação ao estabelecimento dessa problemática, serão necessários maiores estudos para atingir este objetivo. No entanto, os dois tipos de propostas propiciam informações diferentes e complementares. Necessariamente, ambas as avaliações devem ser feitas: a avaliação de eficácia dos bioensaios, para informar sobre sua influência sobre o organismo teste e nas demais análises; e os efeitos dos poluentes, para fornecer detalhes sobre seu impacto nos organismos.

O presente trabalho também corrobora com estudos anteriores do potencial uso da esponja marinha *H. heliophila* como bioindicadora de poluição, pois a espécie exibiu características apontadas pelos pesquisadores Rand e Petrocelli (1985), que a tornam uma espécie com potencial para ensaios ecotoxicológicos de rotina. Referente a esses atributos podemos citar a sua abundância e disponibilidade; facilidade de manutenção em laboratório; conhecimento de sua biologia e fisiologia e significativa representação ecológica dentro das biocenoses.

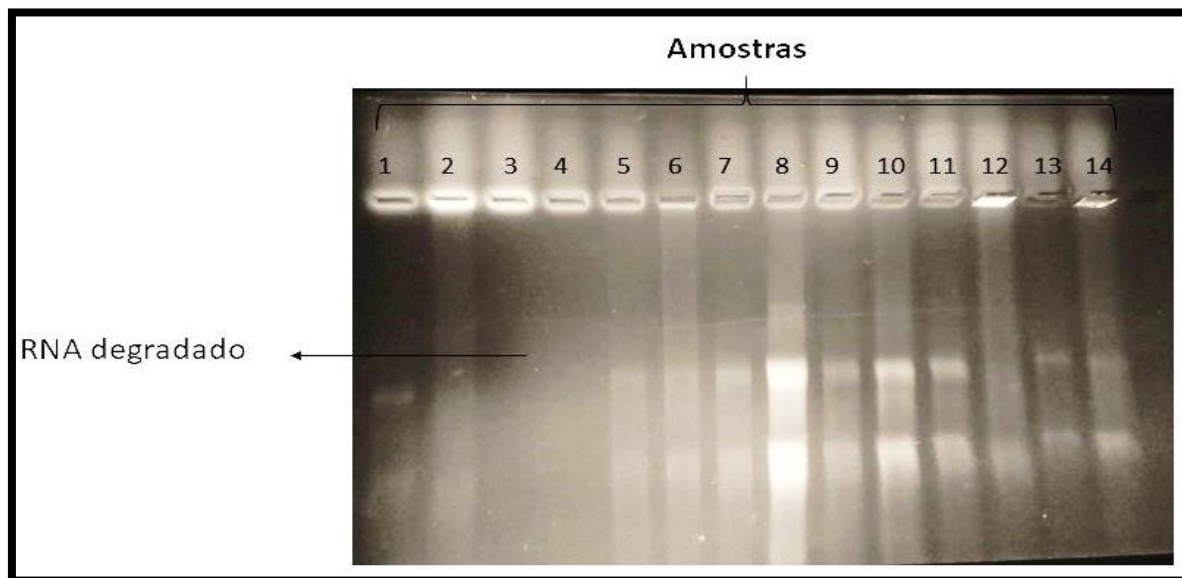
Paralelo ao exposto, Bertoletti (1989), destaca que o rigor na definição e unificação de bioensaios, é fundamental na geração de padrões, afim de se realizar o mesmo nível de controle de toxicidade com os mais diversos poluentes, sendo assim, a padronização dos ensaios de toxicidade, poderá cooperar para o fomento de resultados e comparações com futuras pesquisas, e assim suscitar implicações embasadas em um processo científico para fins ecotoxicológicos.

#### **4.2 Extrações do RNA da esponja marinha *Hymeniacidon heliophila* (Wilson, 1911).**

A seguir serão apresentados e discutidos os resultados das extrações do RNA da esponja marinha *Hymeniacidon heliophila*, por meio dos dois métodos: 1) amostras armazenadas à -80°C; e 2) amostras frescas retiradas diretamente do aquário marinho.

A qualidade do RNA em amostras biológicas é determinada por eletroforese que separa as espécies dominantes de RNA por tamanho. Esses são RNAs ribossômicos (rRNAs), que compõem 85% do RNA total em eucariotos. Estes RNAs ribossômicos eucarióticos são apresentados em quatro tamanhos distintos, referidos como pequenos 5S e 5.8S e longos 18S e 28S, e, portanto, uma boa extração deverá apresentar bandas bem definidas e sem rastros (SIDOVA et al., 2015). O RNA obtido por meio de extração pelo método do *Trizol* (Invitrogen®) – poço 2; 4; 6; 8; 10; 12 e 14, e por meio do Kit de extração Direct-zol RNA Plus™ (Sinapse) – poço 1; 3; 5; 7; 9; 11 e 13, empregando-se as amostras de esponjas armazenadas em freezer -80°C, correspondentes ao experimento do Método I, não apresentaram padrão de fragmentação que permitisse a identificação de bandas no gel (Figura 33), o que caracteriza a degradação do RNA.

Figura 33 - Avaliação da integridade do RNA por gel de agarose e eletroforese - amostras armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .



Legenda: Amostras – Ca10 (1;2); SOL (3;4); T0 (5;6); T1 (7;8); T2 (9;10); T3 (11;12); T4 (13;14).

O armazenamento das amostras pode ter contribuído para a degradação das mesmas. Algumas publicações sugerem que o acondicionamento desse tipo de material deva ocorrer em nitrogênio líquido antes de serem congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  ou em temperaturas inferiores (MELO et al., 2010). Além disso, as amostras não devem ser descongeladas para a extração de RNA, mas sim homogêneas diretamente em isotiocianato de guanidina ou outro agente de extração, o risco de degradação da molécula de RNA durante sua manipulação, por causa da sua alta instabilidade, é um grande desafio para o sucesso das análises de transcriptoma (CLSI, 2015).

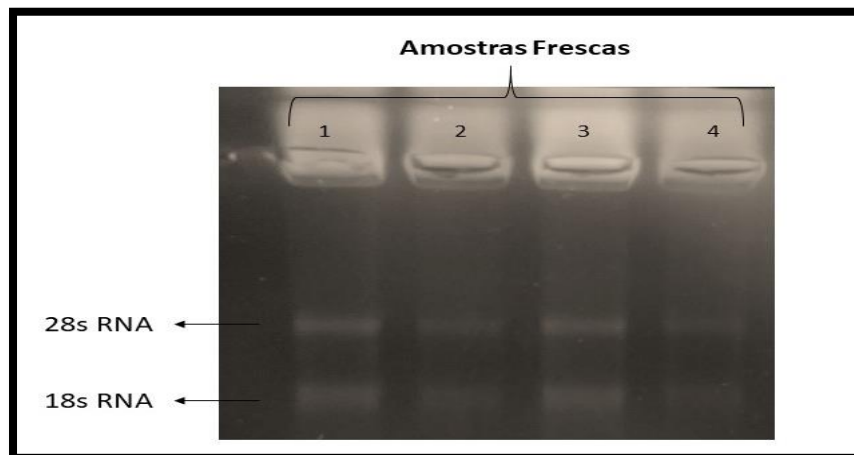
Portanto, o êxito para a obtenção de RNA íntegro depende da rápida inativação de RNases endógenas já nas etapas iniciais do procedimento, em que as células são rompidas e as nucleases celulares têm acesso a ácidos nucleicos, para que seja afastado o risco de degradação, para isso alguns protocolos sugerem a maceração do tecido diretamente em tampão de homogeneização contendo fortes agentes desnaturantes, o quais são capazes de romper as células, solubilizando seus componentes, desnaturando e inibindo RNases endógenas simultaneamente (SAMBROOK, RUSSEL, 2001; MORGANTE et al., 2015).

Contudo, para a extração do RNA, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente, por meio do seu acondicionamento em isopor contendo gelo seco triturado, esse fator também pode ter influenciado na qualidade da extração. Afim de verificarmos essa variável, amostras frescas da esponja marinha *Hymeniacidon heliophila* foram retiradas



diretamente do aquário marinho, e em seguida realizou-se a extração do RNA total por meio do Kit de extração Direct-zol RNA Plus™ (Sinapse). Diante disso o RNA total apresentou um padrão esperado quando da sua análise em gel de agarose a 1%, isto é, a presença de duas bandas correspondente ao RNA ribossomal 28S e 18S (Figura 34).

Figura 34 - Avaliação da integridade por gel de agarose e eletroforese do RNA extraído de amostra fresca.



A banda 28S rRNA aparece mais abundante que a banda 18S rRNA, indicando assim que pouca ou nenhuma degradação do RNA ocorreu durante a extração, diante disso ao comparar os métodos descritos no trabalho, pode-se observar que o método do Trizol seguida da imediata extração do RNA parece ser a melhor metodologia para a extração do RNA de esponjas da espécie *Hymeniacidon heliophila*. Do ponto de vista metodológico, o insucesso das primeiras tentativas na obtenção de uma extração adequada dos RNAs foi um grande problema enfrentado nesse trabalho.

Alguns tecidos apresentam certa dificuldade na extração de ácidos nucleicos de qualidade e o principal problema é que diferentes tecidos variam muito na sua composição, além disso a presença de polissacarídeos, polifenóis e uma grande gama de metabólitos secundários tornam difícil a padronização entre os diferentes tecidos e a obtenção de RNA de alta qualidade (CAMPOS et al., 2010). Comercialmente existem muitos kits e protocolos que realizam a extração de RNA de alta qualidade a partir de pequenas quantidades de material biológico. No entanto, vários desses kits necessitam ser testados para o tecido que se deseja trabalhar e para determinada espécie (INGLIS et al., 2016).

Por isso, para trabalhos que utilizam diferentes tecidos é de extrema importância um método de extração eficiente para todos, independentemente da composição do material, a fim de minimizar as variações que possam existir quando utilizados diferentes protocolos (JAAKOLA et al., 2010). Portanto, estudos pioneiros como esse podem contribuir para o estabelecimento e compreensão de qual a melhor ação a ser escolhida nos processos de extração do RNA da espécie em questão.

O ajustamento de todas estas variáveis metodológicas é responsável por se conseguir uma perfeita extração do RNA, já que esse é um pré-requisito para estudos de expressão gênica incluindo transcriptase reversa (RT), PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), construção de bibliotecas de cDNA ou análises de microarray (CARDILLO et al., 2006). O processo prático elaborado para solucionar esse problema, permitiu protocolar uma melhor ação a ser tomada quanto a extração do RNA da espécie escolhida. Mas a metodologia com melhor aplicação limitou o desenho amostral, além do que impediu que as amostras fossem quantificadas e avaliadas em gel de agarose durante a extração. Ao identificarmos essas variáveis, foi possível otimizar um padrão metodológico para a espécie escolhida, e definir a quantidade de tecido a ser usado, o tampão de extração ideal para preservar as suas propriedades, bem como o tempo e a temperatura de extração e armazenamento das amostras obtidas.

## CONCLUSÕES

Esse estudo padronizou bioensaios de exposição da esponja marinha *Hymeniacidon heliophila* ao estrogênio contraceptivo sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol, bem como propôs uma técnica de extração de RNA mensageiro total da esponja marinha estudada.

Desse modo, com esse estudo foi possível estabelecer um modelo experimental para o monitoramento do desregulador endócrino 17 $\alpha$ -etinilestradiol na esponja marinha *Hymeniacidon heliophila* exposta *in vitro*.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Esse trabalho pode ser complementado por meio da detecção e quantificação dos possíveis genes ativados, a partir da exposição das esponjas ao EE2. Acrescenta-se também a necessidade de realizar ensaios empregando outros tipos de DEs, pois o meio marinho é atingido por uma crescente quantidade deste tipo de substâncias. Embora não tenha sido possível a execução de mais bioensaios com o biocida Diuron, o mesmo pode ser considerado um importante agente disruptor, e por isso experimentos analisando seus efeitos em *Hymeniacidon heliophila* (Wilson, 1911) devem ser padronizados.

Novos ensaios com concentrações mais baixas de hormônio poderão ser apropriados para a obtenção de uma análise mais refinada sobre o assunto, e, adicionalmente, é adequado avaliar os efeitos do EE2 *in situ*, afim de se aferir a ação desse composto em conjunto com outras substâncias com potencial desregulação endócrina.

## REFERÊNCIAS

- ALCOLADO, P.M. 2007. Reading the code of coral reef sponge community composition and structure for environmental biomonitoring: some experiences from Cuba. *Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability*. Rio de Janeiro: Museu Nacional. Série Livros, n. 28, p. 3-10.
- ADAMS, N.R. 1995. Detection of the effects of phytoestrogens in sheep and cattle. *Journal of Animal Science*. v.73: p.1509-1515.
- ADENUGBA, A. et al., 2009. Polychlorinated biphenyls in bile of patients with biliary tract cancer. *Chemosphere*, v.76, n°6, p.841-846.
- ADEOGUNM, A.O. et al., 2016. Endocrine-disruptor molecular responses, occurrence of intersex and gonado-histopathological changes in tilapia species from a tropical freshwater dam (Awba Dam) in Ibadan, Nigeria. *Aquatic Toxicology*, v.174, p.10–21.
- AGENDA 21. 1995. Brasil, Ministério do Meio Ambiente - MMA. Série, ação Parlamentar, n° 56.
- ALI, H.R. et al., 2014. Contamination of diuron in coastal waters around Malaysian Peninsular. *Marine Pollution Bulletin*, v.85, p.287–291.
- ALVES, C. et al., 2007. Exposição ambiental a interferentes endócrinos com atividade estrogênica e sua associação com distúrbios puberais em crianças. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.23, n°5, p.1005-1014.
- ANDERSEN, L. et al., 2006. Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, v.76; p. 343-352.
- AQUINO, S.F.; BRANDT, E.M.F.; CHERNICHARO, C.A.L. 2013. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. *Engenharia Sanitária Ambiental*. v.18, n°3, p.187-204.
- ARIAS, A.R.L. et al., 2007. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciência e Saúde* v.12, p.61-72.
- ARMITAGE, P. D. 1995. Behaviour and ecology of adults in: *The Chironomidae: Biology and Ecology of non-biting midges*. London: Chapman & Hall, p. 194-224.
- ASSUNÇÃO, J.V.; PESQUERO, C.R. 1999. Dioxinas e furanos: Origens e riscos. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo: v.33, n° 5, p.523-530.
- ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2000. Toxicological profile for polychlorinated biphenyls (PCBs). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2011. Toxicological profile for polychlorinated biphenyls (PCBs). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Acesso em: 23 agosto. 2017. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov>.

BAIRD, C. 2002. Química ambiental. 2. ed., Porto Alegre: Bookman, 622 p.

BANGSGAARD, K.; MADSEN, S.S.; KORSGAARD, B. 2006. Effect of waterborne exposure to 4-tert-octylphenol and 17  $\beta$ -estradiol on smoltification and downstream migration in Atlantic salmon, *Salmo salar*. Aquatic Toxicology, v. 80, p.23–32.

BAO, V.W.W. et al., 2011. Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species. Marine Pollution Bulletin, v.62, p.1147–1151.

BARONTI, C. et al., 2000. Monitoring Natural and Synthetic Estrogens at Activated Sludge Sewage Treatment Plants and in a Receiving River Water. Environmental science & technology, v.34, n°24, p.5059-5066.

BASHEER, C.; LEE, H.K., TAN, K.S. 2004. Endocrine disrupting alkylphenols and bisphenol-A in coastal waters and supermarket seafood from Singapore. Marine Pollution Bulletin, v.48, p.1145–1167.

BATISTA-ANDRADE, J.A. et al., 2016. Antifouling booster biocides in coastal waters of Panama: First appraisal in one of the busiest shipping zones. Marine Pollution Bulletin. Acesso em: 02 de setembro de 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.07.045>

BATISTA, D. 2010., Potencial das esponjas marinhas (Filo Porífera) como biomonitoras de poluição no litoral do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Rio de Janeiro. 203 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Departamento de Invertebrados – Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

BATISTA, D. et al., 2013. Marine sponges as bioindicators of oil and combustion derived PAH in coastal Waters. Marine Environmental Research , v 92, p234e243.

BELFROID, A.C. et al., 1999. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in the Netherlands. Science Total Environmental, v.225, p.101– 108.

BELL, A.M.; DUKE, N.C. 2005. Effects of Photosystem II inhibiting herbicides on mangroves – preliminar toxicology trials. Marine pollution Bulletin, v.51, p.297-307.

BENJAMIN, S. et al., 2017. Phthalates impact human health: Epidemiological evidences and plausible mechanism of action. Journal of Hazardous Materials. Acesso em: 30 de agosto de 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.06.036>

BERGMAN, A. et al., 2013. State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012: An assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme and World Health Organization. World Health Organization.

BERTOLETTI, E. Tratabilidade e toxicidade de efluentes industriais. Engenharia Sanitária. Rio de Janeiro, v.28, n.1, p-38-41, 1989.

BEVAN R, et al., 2012. A review of lasted endocrine disrupting chemicals research implications for drinking water. Institute of Environment and Health, Cranfield University – UK, final report DWI:70/2/266.

BIANCO, B. et al., 2010. O papel dos desreguladores endócrinos na fisiopatologia da endometriose: revisão da literatura. Arquivos Brasileiros de Ciência e Saúde, Santo André, v.35, nº2, p.103-110.

BILA, D. M. 2005. Degradação e Remoção da Atividade Estrogênica do desregulador endócrino 17 $\beta$ -estradiol pelo processo de ozonização. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, 277f.

BILA, D.M.; DEZOTTI, M. 2003. Fármacos no Meio Ambiente. Quím. Nova, v.26, nº.4, p. 523-530.

BILA, D.M.; DEZOTTI, M. 2007. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. Química Nova, v. 30, nº 3, p.651-666.

BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. 2003. Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, 295p.

BITENCOURT, G.A. 2011. Avaliação de diferentes métodos para extração de RNA total de folhas e raízes de branquiária. Boletim de pesquisa e desenvolvimento – Embrapa, 22p.

BITTENCOURT, S. et al., 2016. Sorção de poluentes orgânicos emergentes em lodo de esgoto. Engenharia Sanitária Ambiental, v.21, nº.1, p.43-53.

BJORNSDOTTER, K.M.; DE BOER, J.; BALLESTEROS-GÓMEZ, A. 2017. Bisphenol A and replacements in thermal paper: A review. Chemosphere, v.182, p.691 -706.

BRANDT, E.M.F. 2012 Avaliação da remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em sistemas simplificados de tratamento de esgoto (reatores UASB seguidos de pós-tratamento). Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, 128f.

BRASIL, 2011. Atlas de Saneamento 2011. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, 268p.

BRASIL, Ministério da Saúde. 2004. Secretaria de Gestão de Investimentos em Saúde. Manual plano de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde (PGRSS). Goiás, 74p.

BREVES-RAMOS, A. et al., 2005. Succession in rocky intertidal benthic communities in areas with different pollution levels at Guanabara Bay (RJ-Brazil). Braz. Arch. Biol. Technol., v. 48, p. 951-965.

BRIAN QUINN, B. et al., 2006. Evaluation of the lethal and sub-lethal toxicity and potential endocrine disrupting effect of nonylphenol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 142, p.118 – 127.

BROTONS, J.A. et al., 1995. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ Health Perspect*, v.103: p.608-612.

BRULLE, F. et al., 2008. Identification and expression profile of gene transcripts differentially expressed during metallic exposure in *Eisenia fetida* coelomocytes. *Developmental and Comparative Immunology*. v. 32, N° 12, p.1441-1453.

BUSS, F.D.; BAPTISTA, D.F.; NESSIMIAN, J.L. 2003. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.19, n°2, p.465-473.

BUSTAMANTE-MONTES, P. et al., 2001. Ftalatos y efectos en la salud. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. V.17, n°4, p.205-215.

BÖHM, M. et al., 2000. The mitogen- activated protein kinase P38 pathway is conserved in metazoans: cloning and activation of P38 the SAPK2 subfamily from the sponge *Suberites domuncula*. *Biology of the Cell*, v.92, p.95-104.

CAIRNS, J.R.J.; PRATT, J.R. 1989. The scientific basis of bioassays. *Hydrobiologia*. v.188, p.5-20.

CALLISTO, M. et al., Bioindicadores de Qualidade de Água. Laboratório de Ecologia de Bentos. Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas. UFMG, 2005.

CAMPOS, N. A. et al., 2010. Otimização de protocolos de extração de RNA de raiz de milho (*Zea mays*) visando estudos moleculares de alta sensibilidade. Congresso nacional de milho e sorgo, Associação Brasileira de Milho e Sorgo, p.97-104.

CANESI, L. et al., 2003. Effects of PCB congeners on the immune function of *Mytilus* hemocytes: alterations of tyrosine kinase-mediated cell signaling. *Aquatic Toxicology*, v.63, p.293-306.

CAQUET, T. et al., 2013. Risk assessment of herbicides and booster biocides along estuarine continuums in the Bay of Vilaine area (Brittany, France). *Environmental Science Pollution Res*. v.20, p.651-666.

CARDILLO, A.B. et al., 2006. Analysis and sequencing of h6mRNA, last enzyme in the tropane alkaloids pathway from anthers and hairy root cultures of *Brugmansia candida* (Solanacea). *Electronic Journal of Biotechnology*, Valparaíso, V.9, p.196-198.

CARGOUËT, M. et al., 2011. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Science of the Total Environment*, v.324, p.55-66.

CARMAN, R.K. et al., 1995. Experimental effects of polynuclear aromatic hydrocarbons on an estuarine sediment food web. *Marine Environmental Research*, v.40, p.289-318.

CARNEVALI, O. L. et al., 2010. DEHP impairs zebrafish reproduction by affecting critical factors in oogenesis. Acesso em: 20 de setembro de 2017. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0010201>



CASTRO, Í. B.; WESTPHAL, E.; FILLMANN, G. 2011. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. *Química Nova*, v.34, n° 6, p.1021–1031.

CEC - Commission of the European Communities. 2001. On the implementation of the Community strategy for endocrine disrupters—a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. Communication from the Commission to the Council and the European Parliament, Brussels, 262p.

CHAVES, K.S. 2016. Determinação de desreguladores endócrinos Bisfenol A, 17 $\beta$ -estradiol, 17 $\alpha$ -etinilestradiol e Estrona no Rio Paraíba do Sul. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, USP, 134f.

CHESWORTH, J.C; DONKIN, M.E.; BROWN, M.T. 2004. The interactive effects of the antifouling herbicides Irgarol 1051 and Diuron on the seagrass *Zostera marina* (L.). *Aquatic Toxicology*, v.66, p.293-305.

CIOCAN, C. M. et al., 2010. Effects of estrogen exposure in mussels, *Mytilus edulis*, at different stages of gametogenesis. *Environmental Pollution*, v.158, n° 9, p.2977–2984.

CLAPAUCH, R. et al., 2002. Fitoestrogênios: Posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v.46, p.679-694.

CLEMENT, C.R.; COLBORN, T. 1992. Herbicides and fungicides: a perspective on potential human exposure. Princeton Scientific Pub, p. 347-364.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), 2005. Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods; approved guideline.

CLSI document MM13-A. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

COIMBRA, R.S.C. et al., 2013. Biomarcadores como ferramentas na avaliação da qualidade do pescado contaminado com metais traço. *Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego*, v.7, n° 1, p. 153-172.

COLABUONO, F.I. 2011. Poluentes orgânicos persistentes e ingestão de plásticos em albatrozes e petréis (Procellariiformes). Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, USP, 221f.

COLDHAM, N.G. et al., 1997. “Evaluation of a Recombinant Yeast Cell Estrogen Screening Assay”. *Environmental Health Perspectives*, v.105, n°7, 734-742.

COMBALBERT, S.; HERNANDEZ-RAQUET, G. 2010. Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.86, p.1671–1692.

COSTA, P.C.P. Interações socioecológicas na pesca à luz da etnoecologia abrangente: A praia de Itaipu, Niterói/RJ. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas.

- CUNHA, D.L. 2014. Avaliação do padrão de consumo do 17 $\alpha$ -etinilestradiol no município de Santa Maria Madalena - RJ. Dissertação de mestrado, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, 87f.
- DA GAMA, B.A.P.; PEREIRA, R.C.; COUTINHO, R. 2009. Bioincrustação marinha. In: Pereira, R.C. e Soares-Gomes, A. (orgs.) *Biologia Marinha*. 2ª edição, editora Interciência, Rio de Janeiro, p. 299-318.
- DA SILVA, 2009. Ocorrência de PBDEs e PCBs em mexilhões e peixes da Baía de Guanabara. Tese de doutorado, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, PUC-Rio, 196f.
- DAMMANN, A.A. et al., 2011. Comparing biological effects and potencies of estrone and 17-estradiol in mature fathead minnows, *Pimephales promelas*. *Aquatic Toxicology*, v.105, p.559-568.
- DANIELSON, P.B. 2002. The Cytochrome P450 Superfamily: Biochemistry, Evolution and Drug Metabolism in Humans. *Current Drug Metabolism*, vol. 3, nº. 6.
- DE FREITAS, A. J. 2000. Gestão de recursos hídricos: aspectos legais, econômicos, administrativos e sociais. MMA/UFV/ABRH, Brasil, 659p.
- DEBIER, C. et al., 2006. Mobilization of PCBs from blubber to blood in northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) during the post-weaning fast. *Aquatic Toxicology*, v. 80, p.149–157.
- DELORENZO, M.E.; FULTON, H.M. 2012. Comparative risk assessment of permethrin, chlorothalonil, and diuron to coastal aquatic species. *Marine Pollution Bulletin*, v.64, p.1291-1299.
- DESHAYES, S. et al., 2017. Alkylphenol and phthalate contamination of all sources of greywater from French households. *Science of the Total Environment* 599–600, p.883-890.
- DIAS, R.V.A. 2014. Avaliação da ocorrência de microcontaminantes emergentes em sistemas de abastecimento de água e da atividade estrogênica do estinilestradiol. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, 148f.
- DINIZ, et al., 2014. First Appraisal of Water Contamination by Antifouling Booster Biocide of 3rd Generation at Itaquí Harbor (São Luiz - Maranhão - Brazil). *J.Braz. Chem. Soc.* v.25, nº 2, p.380–388.
- DORES, E.F.G.C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E.M. 2001. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em primavera do Leste, Mato Grosso – análise preliminar. *Química Nova*, v.24, nº 1, p.27-36.
- DOS SANTOS, et al., 2015. Avaliação das normas de ensaio aplicadas na quantificação de PCBs em óleo isolante. *Química Nova*, v.38, nº 4, p.471-477.
- DUPONT, F. 2010. O que é Bisfenol A? Acessado em: 27 de agosto de 2017. Disponível em: <http://colunas.cbn.globoradio.globo.com/platb/caminhosalternativos/tag/plastico/>

ERICKSON, B. E. 2002. Analyzing the ignored environmental contaminants. *Environmental Science & Technology*, v.36, p.140-145.

ESTEVEES, A. A. et al., 2007. Validação em laboratório de método analítico para determinação do teor de adipato e ftalato de Di-(2-etil-hexila) utilizados como plastificantes em filmes flexíveis de PVC. *Química Nova*, v.30 n°1. p.219-223.

EULLAFFROY, P.; VERNET, G. 2003. The F684/F735 chlorophyll fluorescence ratio: a potential tool for rapid detection and determination of herbicide phytotoxicity in algae. *Water Research*, v.37, p.1983-1990.

EVANS, S.M.; BIRCHENOUGH, A.C.; BRANCATO, M.S. 2000. The TBT Ban: Out of the Frying Pan into the Fire? *Marine Pollution Bulletin*, v° 40, p.204-211.

FAUST, M.; KORTENKAMP, A. et al., 2010. Summary of expert consultations on approaches to the regulatory assessment of endocrine disrupters. EFSA (European Food Safety Authority), Scientific report of the Endocrine Active Substances Task Force. *EFSA Journal*, v.8, n°11, 1932p.

FERNANDEZ, M.A. et al., 2002. Ocorrência de imposex em *Thais haemastoma*: possíveis evidências de contaminação ambiental por compostos organotínicos no Rio de Janeiro e em Fortaleza, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.18, n° 2, p.463-476.

FERRANTE, M. et al., 2018. In vivo exposure of the marine sponge *Chondrilla nucula* Schmidt, 1862 to cadmium (Cd), copper (Cu) and lead (Pb) and its potential use for bioremediation purposes. *Chemosphere* 193 (2018) 1049e1057

FERREIRA, A.P. 2012. Ocorrência e detecção de desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: complicações ao meio ambiente. *Revista Brasileira de Farmácia*. v.93, n° 2, p.255-264.

FERREIRA, I.D.; MORITA, D.M. 2010. Biodegradação de alcoóis, ftalatos e adipatos em um solo tropical contaminado. *Química Nova*, v.33, n°8, p.1686-1691.

FERREIRA, M.G.M. 2008. Remoção da atividade estrogênica de 17 $\beta$ -estradiol e de 17 $\alpha$ -etinilestradiol pelos processos de ozonização e O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, 156f.

FICHER, M.I; FREITAS, G.R.M. 2011. Descarte de medicamentos. Boletim informativo do centro de informações sobre medicamento do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, n°2. Acesso em 22 de agosto. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/boletimcimrs/descarteboletim.pdf>

FILBY, A.L, et al., 2007. Gene expression profiles revealing the mechanisms of antiandrogen- and estrogen-induced feminization in fish *Aquatic Toxicology*, v. 81; p.219-231.

FONTENELE, E.G.P. et al., 2010. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 54, n°1, p.6-16.

- FRAZÃO, L.R. 2013. Avaliação de biomarcadores moleculares e histológicos em esponja *Hymeniacidon heliophila* para aplicações ambientais. Dissertação de mestrado, Universidade Federal Fluminense, UFF, 70f.
- FROEHNER, S. et al., 2010. Removal Capacity of Caffeine, Hormones, and Bisphenol by Aerobic and Anaerobic Sewage Treatment. *Water, Air & Soil Pollution*, v. 216, p.463-471.
- FROEHNER, S. et al., 2011. Occurrence of Sexual Hormones in Sediments of Mangrove in Brazil. *Water, Air & Soil Pollution*, v. 219, p. 591-599.
- GABRIELSEN, K.M. et al., 2011. Levels and patterns of hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) and their associations with thyroid hormones in hooded seal (*Cystophora cristata*) mother-pup pairs. *Aquatic Toxicology*, v.105, p.482-491.
- GAGNON, M.M.; RAWSON, C.A. 2009. Diuron increases spinal deformity in early life-stage pink snapper *Pagrus auratus*. *Baseline / Marine Pollution Bulletin*, v.58, p.1078-1095.
- GALLO, D. et al., 1999. Reproductive Effects of Dietary Soy in Female Wistar Rats. *Food and Chemical Toxicology*. v. 37, p.493-502.
- GATIDOU, G.; THOMAIDIS, N.S., ZHOU, J.L. 2007. Fate of Irgarol 1051, diuron and their main metabolites in two UK marine systems after restrictions in antifouling paints. *Environ. Int.* v.33, p.70-77.
- GEO – Brasil. 2002. *Perspectivas do Meio Ambiente no Brasil*. Brasília. Edições: IBAMA, 440p.
- GESAMP (IMO/FAO/UNESCO/WMO/WHO/IAEA/UM/UNEP). 1991. Global strategies for marine environmental protection. *Rep. Stud, GESAMP*, (45): 36p.
- GEUNA, F.; HARTINGS, H.; SCIENZA, A. 1998. A new method for rapid extraction of high quality RNA from recalcitrant tissues of grapevine. *Plant Molecular Biology Report*, Athens, v.16, p 61-67.
- GHISELLI, G. 2006. Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: Ocorrência e determinação dos Interferentes Endócrinos (IE) e Produtos Farmacêuticos e de Higiene Pessoal (PFHP). Tese de doutorado Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 181f.
- GHISELLI, G.; JARDIM, W.F. 2007. Interferentes endócrinos no ambiente. *Quim. Nova*, v. 30, nº 3, p.695-706.
- GIACOMAZZI, S.; COCHET, N. 2004. Environmental impact of diuron transformation: a review. *Chemosphere*, v. 56, p.1021-1032.
- GIROTTI, M. et al., 2012. Eficiência fotossintética de cultivares de cana-de-açúcar e de diferentes espécies de plantas daninhas após a aplicação do diuron. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v. 30, nº 3, p.599-606.

GLASBY, T. M.; UNDERWOOD, A. J. 1996. *Sampling to differentiate between pulse and press perturbations. Environmental Monitoring and Assessment*, 42(3).

GOLOUBKOVA, T.; SPRITZER, P.A. 2000. Xenoestrogênios: o exemplo do Bisfenol-A. *Arq. Bras. Endocrinol Metab*, v. 44, nº4, 323-330.

GUILLETTE, L.J. et al., 1996. Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living a contaminated environment. *General and Comparative Endocrinology*, v. 101, nº 1, p.32-42.

GUILOSKI, I.C. 2014. Efeitos bioquímicos, genéticos, hematológicos, morfológicos e reprodutivos dos micropoluentes diclofenaco e paracetamol em *Rhamdia quelen* (Pisces, Teleostei). Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, UFPR, 96f.

GUIMARÃES, R.M.; ASMUS, C.I.R. 2010. Desreguladores endócrinos e efeitos reprodutores em adolescentes. *Cad. Saúde Colet.*, Rio de Janeiro, v.18, nº 2, p.203-208.

GUIMARÃES, T. S. 2008. Detecção e quantificação dos hormônios sexuais 17  $\beta$ -estradiol (E2), estriol (E3), estrona (E1) e 17  $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) em água de abastecimento: estudo de caso da cidade de São Carlos, com vistas ao saneamento ambiental. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, USP, 81f.

HALL M.J.; KORACH S.K. 2013. Endocrine disrupting chemicals promote the growth of ovarian cancer cells via the ER-CXCL12-CXCR4 signaling axis. *Molecular carcinogenesis*, v. 52, p.715–725.

HAMID, H.; ESKICIOGLU, C. 2012. Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. *Water Research*, v. 46, nº 18, p.5813–5833.

HARAGUCHI, K., HISAMICHI, Y.; ENDO, T. 2009. Accumulation and mother-to-calf transfer of anthropogenic and natural organohalogenes in killer whales (*Orcinus orca*) stranded on the Pacific coast of Japan. *Science Total Environment*, v.407, nº 8. p.2853-2859.

HARINO, H. et al., 2005. Monitoring of antifouling booster biocides in water and sediment from the port of Osaka, Japan. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* v.48, p.303–310

HARLEY, K. 2013. Prenatal and early childhood bisphenol A concentrations and behavior in school-aged children. *Environ. Res.* v. 126, p. 43-50.

HASSELBERG, L.; et al., 2004. Effects of alkylphenols on CYP1A and CYP3A expression. in first spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquatic Toxicology*, 67, p303–313.

HATEF, A. et al., 2012. Adverse effects of bisphenol A on reproductive physiology in male goldfish at environmentally relevant concentrations. *Ecotoxicology and Environmental Safety* v. 76, p.56-62.

HEITHAUS, M.R.; WIRSING, A.J.; DILL, L.M. 2012. The ecological importance of intact top predator populations: a synthesis of 15 years of research in a seagrass ecosystem. *Marine and Freshwater Research*, v. 63, p.1039-1050.

- HEMMER, M.J. et al., 2002. Vitellogenin mRNA regulation and plasma clearance in male sheepshead minnows, (*Cyprinodon variegatus*) after cessation of exposure to 17-estradiol and p-nonylphenol. *Aquat. Toxicol.* v.58, p.99–112.
- HILL, M. et al., 2002. Toxic effects of endocrine disrupters on freshwater sponges: common developmental abnormalities. *Environmental Pollution*, v.117, p.295–300.
- HOGAN, N.S.; LEAN, D.R.S.; TRUDEAU, V.L. 2006. Exposures to estradiol, ethinylestradiol and octylphenol affect survival and growth of *Rana pipiens* and *Rana sylvatica* tadpoles. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v.69, p.1555–1569.
- HOLFFMANN, F.; KLOAS, W. 2012. Estrogens can disrupt amphibian mating behavior. *Plos one*, v. 7. Issue 2.
- HOLLIDAY, D.K.; ELSKUS, A.A.; ROOSENBERG, W.M. 2009. Impacts of multiple stressors on growth and metabolic rate of *Malaclemys terrapin*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 28, nº. 2, p. 338–345.
- HOLLIDAY, D.K.; HOLLIDAY, C.M. 2012. The effects of the organopollutant PCB 126 on bone density in juvenile diamondback terrapins (*Malaclemys terrapin*). *Aquatic Toxicology*, v. 109, p. 228–233.
- HUTCHINSON, T.H. et al., 1999. Life-cycle studies with marine copepods (*Tisbe battagliai*) exposed to 20-hydroxyecdysone and diethylstilbestrol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 18, nº 12, p.2914–2920.
- HYNDMAN, K.M. et al., 2010. Assessing the effects of exposure timing on biomarker expression using 17-estradiol. *Aquatic Toxicology*, v.96, p.264-272.
- INGLIS, P.W.; PAPPAS, M.C.R.; GRATTAPAGLIA, D. 2016. Protocolo de Extração de DNA e RNA de Alta Qualidade para Espécies Ricas em Compostos Secundários. Embrapa, Comunicado Técnico, 204.
- IRWIN, L.K.; GRAY, S.; OBERDORSTER, E. 2001. Vitellogenin induction in painted turtle, *Chrysemys picta*, as a biomarker of exposure to environmental levels of estradiol. *Aquatic Toxicology*, v. 55, p. 49–60.
- JAAKOLA, L.; SUOKAS, M.; HÄGGMAN, H. 2010. Novel approaches based on DNA barcoding and high-resolution melting of amplicons for authenticity analyses of berry species. *Food Chemistry Colney*, v.123, p. 494-500.
- JEFFERSON, W.N., PADILLA-BANKS, E., NEWBOLD, R.R. 2007. Disruption of the developing female reproductive system by phytoestrogens: Genistein as an example. *Molecular Nutrition and Food Research*, v. 51, p.832-844.
- JENNY, M.J. et al., 2002. Potential indicators of stress response identified by expressed sequence tag analysis of hemocytes and embryos from american oyster, *Crassostrea virginica*. *Mar. Biotechnol.* v. 4, p. 81-93.

JOBLING, S. et al., 2003. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquatic Toxicology*, v. 65, p. 205-220.

JOHNSON, A. C., BELFROID, A., DI CORCIA, A. 2000. "Estimating Steroid Oestrogen Inputs into Activated Sludge Treatment Works and Observations on their Removal from the Effluent", *The Science of the Total Environment*, v. 256, p. 163-173.

JONSSON, C.M.; CASTRO, V.L. 2005. Bioindicadores e biomarcadores de agroquímicos no contexto da relação saúde-ambiente. EMBRAPA, acesso em 25 de setembro de 2017. Disponível em: [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Jonsson\\_Castro\\_biomarcadoresIDU4Vhi5C93K.pdf](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Jonsson_Castro_biomarcadoresIDU4Vhi5C93K.pdf)

KA, A. et al., 2011. Evidence suggesting that di-n-butyl phthalate has antiandrogenic effects in fish. *Environ Toxicol Chem.* v. 30, nº 6, p. 1338-45.

KHANAM, M.R. et al., 2017. Diuron causes sinking retardation and physiochemical alteration in marine diatoms *Thalassiosira pseudonana* and *Skeletonema marinoi-dohrnii* complex. *Chemosphere*, v. 175, p. 200- 209.

KIM, K.; PARK, H. 2013. Association between urinary concentrations of bisphenol A and type 2 diabetes in Korean adults: A population based cross-sectional study. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, v.216, p. 467–471.

KIM, N.S. et al., 2014. Assessment of TBT and organic booster biocide contamination in seawater from coastal areas of South Korea. *Marine Pollution Bulletin*, v. 78, p. 201–208.

KLEVENS, E.R. et al., 2007. Burden of Healthcare- Associated Infections in the United States, 2002. *Pub Rep*, v. 122, p. 160-166.

KLINFELTER, K. et al., 2018. Genetic differences in the aryl hydrocarbon receptor and CYP1A2 affect sensitivity to developmental polychlorinated biphenyl exposure in mice: relevance to studies of human neurological disorders. *Mammalian Genome* , v 29, p112–127

KNAUERT S. et al., 2008. Mixture Toxicity of Three Photosystem II Inhibitors (Atrazine, Isoproturon, and Diuron) Toward Photosynthesis of Freshwater Phytoplankton Studied in Outdoor Mesocosms. *Environ. Sci. Technol.* v. 42, p. 6424–6430.

KOLATOROVA, L. et al., 2017. Determination of selected bisphenols, parabens and estrogens in human plasma using LC-MS/MS. acesso em: 22 de agosto de 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.05.070>

KORTENKAMP, A. et al., 2011. State of the art assessment of endocrine disrupters. Final report. Acesso em 18 de agosto de 2017. Disponível em: [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/sota\\_edc\\_final\\_report](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/sota_edc_final_report).

KRASKO, A.; et al., 2001. Potential multidrug resistance gene POH1: an ecologically relevant indicator in marine sponges. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 20, Nº1, p. 198–204.

KUCH HM, BALLSCHMITTER K. 2001. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCD)-MS in the picogram per liter range. *Environ Sci Technol*, v. 35, p. 3201–3206

KUMAR, D.; THAKUR, U.K. 2017. Anxiety like behavior due to perinatal exposure to Bisphenol-A is associated with decrease in excitatory to inhibitory synaptic density of male mouse brain. *Toxicology Volume* v. 378, p. 107–113.

KURELEC, B., KRČA, S., PIVČEVIC, B., UGARKOVIĆ, D., BACHMANN, M., IMSIECKE, G., & MÜLLER, W. E. (1992). Expression of P-glycoprotein gene in marine sponges. Identification and characterization of the 125 kDa drug-binding glycoprotein. *Carcinogenesis*, 13(1), 69-76.

KUSTER, M. et al., 2008. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *Journal of Hydrology*, v. 358, p. 112-123.

KUSTER, M. et al., 2010. Fate of selected pesticides, estrogens, progestogens and volatile organic compounds during artificial aquifer recharge using surface waters. *Chemosphere*, v.79, n° 8, p. 880-886.

KÖHLER, G.O. 2016. A responsabilidade civil das organizações produtoras de embalagens plásticas em contato com alimentos: o caso do Bisfenol A e dos Ftalatos. Tese de doutorado, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS, 313f.

LAMOREE, M.H. et al., 2002. Determination of diuron and the antifouling paint biocide Irgarol 1051 in Dutch marinas and coastal waters. *Journal of Chromatography A*, v. 970, p. 183–190.

LARINI, L. 1999. *Toxicologia dos Praguicidas*. São Paulo: Manole, 230p.

LEWIS, R. W. 2013. Risk assessment of “endocrine substances”: Guidance on identifying endocrine disruptors. *Toxicology Letters*, v. 223, n° 3, p. 287–290.

LINDER, J.A.; STAFFORD, R.S. 2001. Antibiotic treatment of adults with sore throat by community primary care physicians: A national survey. *JAMA*. 286(10), p.1181-6.

LINTELMANN, J. et al., 2003. Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem*, v. 75, n° 5, p. 631–681.

LIU, W.; et al., 2018. Removal and Biodegradation of 17 $\beta$ -Estradiol and Diethylstilbestrol by the Freshwater Microalgae *Raphidocelis subcapitata* *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 15; 452.

LOUIS, D. et al., 2016. Gene expression biomarkers of heat stress in scleractinian corals: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.08.007>

LOUREIRO, I.R. 2002. A importância e ocorrência de ftalatos em água potável e no ecossistema da Baía de Guanabara. Tese de doutorado, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, PUC-Rio, 143 f.



- LUNA, O.T.; PLAUTZ, S.C.; SALICE, C.J. 2014. Chronic Effects of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, fluoxetine, and the Mixture on Individual and Population-Level End Points in *Daphnia magna*. *Arch Environ Contam Toxicol*, v. 68, n $^{\circ}$  4, p. 603-611.
- LUNDQVIST, C. et al., 2006. The effects of PCBs and dioxins on child health. *Acta Paediatrica*, v. 95, p. 453: 55-64.
- LUZIO, A. et al., 2016. Development and recovery of histopathological alterations in the gonads of zebrafish (*Danio rerio*) after single and combined exposure to endocrine disruptors (17 $\beta$ -ethinylestradiol and fadrozole). *Aquatic Toxicology*, v.175, p. 90–105.
- LYONS, S.; VEEKEN, H.; LONG J. 2003. Visceral leishmaniasis and HIV in Tigray, Ethiopia. *Trop Med Int Health*, v. 8, n $^{\circ}$  8, p. 733-739.
- MA, J. et al., 2006. Toxicity assessment of 40 herbicides to the green alga *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 63, n $^{\circ}$  3, p. 456-462.
- MACEDO, J. A. B. 2011. Química Ambiental – Uma ciência ao alcance de todos. Belo Horizonte: CRQ-MG, p.752.
- MAGALHÃES, D.P.; FERRÃO FILHO, A.S. 2008. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras*, v.12, n $^{\circ}$  3, p. 355-381.
- MAGGIOLI, J.; HOOVER, A.; WENG, L. 2006. Toxicogenomic analysis methods for predictive toxicology. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v.53, p. 31-37.
- MAIDA, M. E FERREIRA, B. P. 1997. Coral reefs of Brazil: an overview. In: *Proceedings of the 8th International Coral Reef Symposium*, v. 1, p. 263-74
- MALISCH, R.; KOTZ, A. 2014. Dioxins and PCBs in feed and food — Review from European perspective. *Science of the Total Environment*. v. 491-492, p.2-10.
- MANAHAN, S.E. 2003. *Toxicological Chemistry and Biochemistry*, 3rd ed., Lewis Publishers: Boca Raton, 425p.
- MANSANO, A.S. 2017. Effects of diuron and carbofuran and their mixtures on the microalgae *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 142, p. 312-321.
- MARTÍNEZ, K.; FERRER, I.; BARCELÓ, D. 2000. Part-per-trillion level determination of antifouling pesticides and their byproducts in seawater samples by off-line solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatography– atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 879, p.27–37.
- MCGEE, M.R. et al., 2009. Predator avoidance performance of larval fathead minnows (*Pimephales promelas*) following short-term exposure to estrogen mixtures. *Aquatic Toxicology*, v. 91, p. 355–361.
- MCLACHLAN, J. A.; SIMPSON, E.; MARTIN, M. 2006. Endocrine disrupters and female reproductive health. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 20, n $^{\circ}$  1, p. 63-75.

- MEAD, R. 1988. The design of experiments. Cambridge, New York: Cambridge University Press. 620 p.
- MEHBUB, M., LEI, J., FRANCO, C., & ZHANG, W. (2014). Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: Trends and opportunities for discovery of bioactives. *Marine drugs*, 12(8), 4539-4577.
- MELLO, G.S.L. et al., 2013. Panorama da contaminação das águas superficiais por estrogênios no Brasil. v.1, p.1-11.
- MELO, A.S.; HEPP, L.U. 2008. Ferramentas estatísticas para análises de dados provenientes de biomonitoramento. *Oecol. Bras.*, v. 12, nº 3, p. 463-486.
- MELO, M. R. et al., 2010. Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular. *J Bras Patol Med Lab*, v. 46, n. 5, p. 375-381.
- MEYER, A. et al., 1999. Estarão alguns grupos populacionais brasileiros sujeitos à ação de disruptores endócrinos? *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro: v. 15, nº 4, p. 845-850.
- MICHAEL, E.; HUBER, P.C. 2012. *Biologia Marinha* - 8ª Ed.
- MICHAEL, I. et al., 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review. *Water Research*, v. 47, p.957-995.
- MIERZWA, J.C.; AQUINO, S.F.; VERAS, L.R.V. 2009. Remoção de Desreguladores Endócrinos. In: Programa de Pesquisa em Saneamento Básico, edital 5 (PROSAB 5). Remoção de microorganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano. Valter Lucio de Pádua (coordenador). Rio de Janeiro: ABES.
- MIRANDA, et al., 2018. Do invasive corals alter coral reef processes? An empirical approach 2 evaluating reef fish trophic interactions. *Marine Environmental Research*, v 138, p19-27.
- MONCAUT, N.; LO NOSTRO, F.; MAGGESE, M.C. 2003. Vitellogenin detection in surface mucus of the South American cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) induced by estradiol-17b. Effects on liver and gonads. *Aquatic Toxicology*, v. 63, p. 127-137.
- MONTAGNER, C.C.; JARDIM, W.F. 2011. Spatial and Seasonal Variations of Pharmaceuticals and Endocrine Disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil). *Journal of the Brazilian Chemical Society* v. 22, p. 1452-1462.
- MORAES, D.S.L.; JORDÃO, B.Q. 2002. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. *Rev. Saúde Pública*, v. 36, nº 3, p. 370-374.
- MORGANTE, C.V.; et al., 2015. Protocolo de extração de RNA total de *Arachis* spp. e avaliação do efeito de contaminantes por meio de análises espectrofotométricas. 25 p. il. (Embrapa Semiárido. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 121). Acesso em: 08/01/2018. Disponível em: <http://www.embrapa.br/semiario>

- MOS, L. et al., 2007. Contaminant-associated disruption of vitamin A and its receptor (retinoic acid receptor) in free-ranging harbour seals (*Phoca vitulina*). *Aquatic Toxicology*, v. 81, p. 319-328.
- MOTHES, B.; LERNER, C.; DA SILVA, C.M.M. 2003. Guia ilustrado – Esponjas marinhas – Costa Sul-Brasileira. Pelotas/RS:USEB, Coleções Manuais de Campo, 82p.
- MURICY, G.; HAJDU, E. 2006. Porifera brasilis. Guia de identificação das esponjas marinhas mais comuns do Sudeste do Brasil. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 104 p. (série Livros 17).
- MURICY, G.; SILVA, O.C. 1999. Esponjas Marinhas do Estado do Rio de Janeiro: Um recurso renovável Inexplorado. Série Oecologia Brasiliensis, Vol II, pp. 155-178.
- MÜLLER, W.E.G.; et al., 2001. Suppression of allograft rejection in the sponge *Suberites domuncula* by FK506 and expression of genes encoding FK506-binding
- MÜLLER, W.E.G; STEFFEN, R.; RINKEVICH, B.; KURELEC B. 1996. Multixenobiotic resistance mechanism in the marine sponge *Suberites domuncula*: Its potential application in assessment of environmental pollution. *Mar Biol* 125:165–170.
- NASCIMENTO, M.T.L. 2016. Avaliação da presença de micropoluentes, atividade estrogênica e toxicidade na água da Baía da Guanabara. Tese de doutorado, Universidade Federal Fluminense, UFF, 176f.
- NAVAS, J.M.; SEGNER, H. 2001. Estrogen-mediated suppression of cytochrome P4501A (CYP1A) expression in rainbow trout hepatocytes: role of estrogen receptor *Chemico-Biological Interactions* 138, 285–298.
- NETO, J.A.B.; WALLNER-KERSANACH, M.; PATCHINEELAM, S.M. 2008. Poluição marinha. Rio de Janeiro, Interciência, 440p.
- NEUWOEHNER, J. et al., 2008. QSAR analysis and specific endpoints for classifying the physiological modes of action of biocides in synchronous green algae. *Aquatic Toxicology* v. 90, nº 1, p. 8-18.
- NOGUEIRA, J.M.F. 2002. Desreguladores Endócrinos: Efeitos Adversos e Estratégias para Monitorização dos Sistemas Aquáticos. *European Journal of Imo' Tonic Chemistry*, p.65-71.
- NOGUEIRA, J.M.F. 2003. Desreguladores endócrinos: Efeitos adversos e estratégias para monitorização dos sistemas aquáticos. *Química*, n.88, p. 65-71.
- NOHYNEK, G.J. et al., 2013. Endocrine disruption: Fact or urban legend? *Toxicology Letters* v. 223, p. 295–305.
- NOTCH EG, et al., 17a-Ethinylestradiol decreases expression of multiple hepatic nucleotide excision repair genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, v. 84, p. 301-309.
- NUNES, B. 2011. A presença de fármacos no meio ambiente. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, v.1, nº 1, p.43-54.

N'TUMBA-BYN, T. et al., 2012. Differential Effects of Bisphenol A and Diethylstilbestrol on Human, Rat and Mouse Fetal Leydig Cell Function. Plos One, v.7.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. et al., 2005. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. Aquat. Toxicol., v. 74, p.53–69.

OLIVEIRA, D.P. et al., 2007. Alquilfenóis e alquilfenóis etoxilados: uma visão ambiental. Revista Brasileira de Toxicologia, v. 20, nº 1 e 2, p. 1-12.

OLIVEIRA, M.M. 2015. Monitoramento de desreguladores endócrinos no rio Arroio Fundo na bacia de Jacarepaguá, RJ. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ, 121f.

OLSVIK, P.A. et al., 2009. Transcriptional effects of nonylphenol, bisphenol A and PBDE-47 in liver of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). Chemosphere, v. 75, nº 3, p. 360-367.

OTURAN, N., TRAJKOVSKA, S., OTURAN, M.A., COUDERCHET, M., AARON, J.J. 2008. Study of the toxicity of diuron and its metabolites formed in aqueous medium during application of the electrochemical advanced oxidation process “electro-Fenton”. Chemosphere, v. 73, p. 1550-1556.

PEDRETE, T.A. 2013. Avaliação da esponja *Hymeniacidon heliophila* (Porifera: Halichondrida) como biomonitora para HPAs e uso de biomarcadores para verificar a toxicidade. dissertação de mestrado, Pontifícia Universidade Católica DO RIO DE JANEIRO, 181f.

PEDRETE, T.A, et al., Toxicity evaluation of PAHs in the sponge *Hymeniacidon heliophila*: field assessment and laboratory assays - a preliminary study. Ecotoxicol. Environ. Contam., v. 12, nº 1.

PEIXINHO, F.C. 2010. Gestão sustentável dos recursos hídricos. XVI Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas e XVII Encontro Nacional de Perfuradores de poços, São Luís – MA. p.1–16.

PENTEADO, J. C. P.; VAZ, J. M. O legado das bifenilas policloradas (PCBs) Química Nova 2001, v. 24, nº 24, p.390-398.

PEREIRA, R.O, et al., 2013. Degradação parcial de 17 $\beta$ -estradiol por cloração aplicada ao tratamento da água. Eng Sanit Ambient. v. 18, nº 3, p.215-222.

PEREIRA, R.S. 2004. Poluição hídrica: causas e consequências. Revista Eletrônica de Recursos hídricos. IPH-UFRGS, v. 4, nº 1, p. 20-36.

PEREZ, T. et al., 2003. Marine Sponges as Biomonitor of Polychlorobiphenyl Contamination Concentration and Fate o 24 Congeners. Environ. Sci. Technol. Vol. 37, nº10.

- PERINA, F.C. 2009. Avaliação da toxicidade de biocidas utilizados em tintas antiincrustantes. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande, FURG, 120f.
- PHILLIPS, D.J.H.; RAINBOW, P.S. 1993. Biomonitoring of trace aquatic contaminants. London: Elsevier Science Publishers, v. 37, 371p.
- PIMENTEL, M.F. 2013. Biomarcadores de contaminação aquática em baiacus (*Sphoeroides testudineus*) coletados no Estuário do rio PACOTI-CE. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará, UFC, p.142.
- PIVNENKO, K. et al., 2015. Bisphenol A and its structural analogues in household waste paper. Waste Management. Acesso em: 22 de Agosto de 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2015.07.017>
- PIÑA, B.; CASADO, M.; QUIRÓS, L. 2007. Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring. Trends in Analytical Chemistry. v. 26, nº 11.
- POJANA, G. et al., 2007. Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. Environment International, v. 33, p. 929–936.
- POLI, M. et al., 2009. Manual de anticoncepção da FEBRASGO. FEMINA, v. 9, 37p.
- PRIAC, A. et al., 2017. Alkylphenol and alkylphenol polyethoxylates in water and wastewater: a review of options for their elimination. Arabian Journal of chemistry, v.10, p. 3749-3773.
- PRINCE, M.M. et al., 2006. Mortality and exposure response among 14.458 electrical capacitor manufacturing workers exposed to polychlorinated biphenyls (PCBs). Environmental Health Perspectives, v.114, nº10, p.1508-1514.
- PURDOM, C. et al., 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. Chemistry and Ecology. v. 8, p. 275 – 285.
- RAIMUNDO, C. C. M. 2007. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 138f.
- RAND, G. M.; PETROCELLI, S.R. 1985. Fundamentals of aquatic toxicology. Washington, 665p.
- RANKOUHI T. R. et al., 2005. Effects of environmental and natural estrogens on vitellogenin production in hepatocytes of the brown frog (*Rana temporaria*). Aquatic Toxicology, v. 71, p. 97–101.
- RAY, G. C. 1987. Coastal-zone biodiversity patterns: principles of landscape ecology may help explain the processes underlying coastal diversity. Bioscience. v. 47, nº 7, p. 490- 498.
- READMAN, J.W. 1999. Assessment of antifouling agents in coastal environments. Progress Report, EU Project MAST III PL971620.
- RECIO-VEGA, R. et al., 2011. Serum levels of polychlorinated biphenyls in Mexican women and breast cancer risk. Journal of Applied Toxicology, v.31, nº 3, p. 270-278.

REGITANO, J.B.; LEAL, R.M.P. 2010. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. R. Bras. Ci. Solo, v. 34, p.601-616.

REGNAULT, C. et al., 2016. Metabolic and immune impairments induced by the endocrine disruptors benzo[a]pyrene and triclosan in *Xenopus tropicalis*. Chemosphere, v.155, p.519 - 527.

REIS FILHO, R. W.; LUVIZOTTO-SANTOS, R.; VIEIRA, E.M. 2007. Poluentes Emergentes como desreguladores endócrinos. J. Braz. Soc. Ecotoxicol., v. 2, nº 3, p.283-288.

REYS, L. L. 2001. Tóxicos ambientais desreguladores do sistema endócrino. Revista da Faculdade de Medicina de Lisboa. v. 6, p. 213-225.

RIBEIRO, A.R. et al., 2010. Microbial degradation of 17-estradiol and 17-ethynylestradiol followed by a validated HPLC-DAD method. Journal of Environmental Science and Health – Part B – Pesticides, food contaminants and agricultural wastes, v. 5, nº 4, p. 265-273.

ROCHA, G.C. 2012. Avaliação da atividade estrogênica das águas do rio Paraíba do sul. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, USP, p.189.

RODRIGUES, E.M. 2014. Vulnerabilidade e variações de curto prazo da praia de Itaipu (Niterói-RJ) em resposta às mudanças nas condições de mar. Rev. Tamoios, São Gonçalo (RJ), ano 10, n. 2, pág. 69-79.

ROSENBERG, D.M.; RESH, V.H. 1993. Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates. New York, Chapman & Hall. 488 p.

RUHLEN, R.L. et al., 2008. Low phytoestrogen levels in feed increase fetal serum estradiol resulting in the “fetal estrogenization syndrome” and obesity in CD-1 mice. Environ. Health Perspect., v. 116, nº 3, p.322-328.

SALEH, A. et al., 2015. Antifouling paint booster biocides (Irgarol 1051 and diuron) in marinas and ports of Bushehr, Persian Gulf. Marine Pollution Bulletin. Acesso em: 01 de setembro de 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.02.037>

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SANCHES, A.L.M. 2014. Avaliação dos efeitos deletérios do diuron e de seus metabólitos em lambaris (*Astyanax* sp.): testes de toxicidade, marcadores de estresse oxidativo, marcadores genotóxicos e enzimas de biotransformação. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, UNESP, 79f.

SANCHES, S.M. et al., 2003. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente, Curitiba, v. 13, p. 53-58.

SANCHEZ, D.C.O. 2006. Desreguladores endócrinos na indução da vitelogenina em peixes nativos. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, UFPR, 46p.

SANSEVERIANO, M.T.V.; SPRITZER, D.T.; SHÜLLER-FACCINI, L. 2001. Manual de teratogênese. Porto Alegre: ed.1º, editor da UFRGS, 556p.

SANTOS, E.T. 2010. Effects of soy isoflavones on the uterus and urethra of ovariectomized rats. *International Urogynecology Journal*, v. 21, p.111-116.

SAPOZHNIKOVA, Y. 2008. Distribution of antifouling biocides in California marinas. *J. Environ. Monit.* v. 10, p. 1069–1075.

SAVASTANO, S. et al., 2015. Bisphenol-A plasma levels are related to inflammatory markers, visceral obesity and insulin-resistance: a cross-sectional study on adult male population. *Journal Translational Medicine*, v.13, 169p.

SCHIAVINI, J.A.; CARDOSO, C.A.; RODRIGUES, W.C. 2011. Desreguladores endócrinos no Meio Ambiente e o Uso de Potenciais Bioindicadores. *Rev. Eletrônica - TECCEN*, v.4, p.33-48.

SCHRAMM, K.W. et al., 2008. Impact of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol on the plankton in freshwater microcosms—I: Response of zooplankton and abiotic variables. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 69, p. 437–452.

SERENO, D.B. 2011. Poluentes marinhos como fatores de estresse em esponjas e mexilhões. Dissertação de mestrado, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ, 90 f.

SHAALA, N.M.A. et al., 2015. Lethal concentration 50 (LC50) and effects of Diuron on morphology of brine shrimp *Artemia salina* (*Branchiopoda: Anostraca*) Nauplii. *Procedia Environmental Sciences*, v. 30, p. 279 – 284.

SHAPPELL, N.W. et al., 2010. Comparative biological effects and potency of 17- $\alpha$ -etinilestradiol and 17-estradiol in fathead minnows. *Aquatic Toxicology*, v. 100, p. 1–8.

SHEIKH, M.A. et al., 2009. Detection and ecological threats of PSII herbicide diuron on coral reefs around the Ryukyu Archipelago, Japan. *Marine Pollution Bulletin*, v. 58, p. 1922–1952.

SHEN, Y. 2015. Higher Urinary Bisphenol A Concentration Is Associated with Unexplained Recurrent Miscarriage Risk: Evidence from a Case Control Study in Eastern China. *PLoS One*, v. 10, nº 5.

SIDOVA, M.; et al., 2015. Effects of post-mortem and physical degradation on RNA integrity and quality. *Biomolecular Detection and Quantification*, v.5, p. 3–9.

SILVA, C. et al., 2009. Organochlorine compounds in sharks from the Brazilian coast. *Marine Pollution Bulletin*, v.58, nº 2, p.294-298.

SILVA, G.G.M. 2015. Avaliação da qualidade de águas superficiais e de sedimentos quanto à toxicidade e atividade estrogênica. Dissertação de mestrado, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ, 119f.

SILVA, M.C.; CONFORTI, V.A. 2013. Disruptores endócrinos. *Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia*, v.9, nº 17; p.1098.

SODRÉ, F. F. M.; C. C.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. 2007. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da Região de Campinas (SP, Brasil). *Braz. Soc. Ecotoxicol*, v. 2, n° 2, p. 187-196.

SONNENSCHNEIN, C.; SOTO, A.M. 1998. An Updated Review of Environmental Estrogen and Androgen Mimics and Antagonists. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol*, v. 65, n° 1-6, p. 143-150.

SOUZA, N.C. 2011. Avaliação de micropoluentes emergentes em esgotos e águas superficiais. Tese de doutorado, Universidade Federal do Ceará, UFC, p.180.

SOUZA, T. S., FONTANETTI, C. S. 2007. Ensaio do Cometa para Avaliação da Qualidade das Águas do Rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma Refinaria de Petróleo. 4ª PDPETRO. Campinas, p. 1-10.

SPENGLER, P.; KÖRNER, W.; METZGER, J.W. 2001. Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 20, n° 10, p. 2133–2141.

SPATARO, V.; TODA, T.; CRAIG, R.; SEEGER, M.; DUBIEL, W.; HARRIS, A.L.; NORBURY, C. 1997. Resistance to diverse drugs and ultraviolet light conferred by overexpression of a novel human 26 S proteasome subunit. *J Biol Chem* 272:30470–30475

STUART-SMITH, S.J.; JEPSON, P.D. 2017. Persistent threats need persistent counteraction: Responding to PCB pollution in marine mammals. *Marine Policy*, v.84, p. 69–75.

TEISSEIRE, H.; COUDERCHET, M.; VERNET, G. 1999. Phytotoxicity of diuron alone and in combination with copper or folpet on duckweed (*Lemna minor*). *Environmental Pollution*, v. 106, n° 1, p. 39-45.

THOMAS K. V.; BLAKE, S. J.; WALDOCK M. J. 2000. Antifouling Paint Booster Biocide Contamination in UK Marine Sediments. *Marine Pollution Bulletin*, v.40, n° 9, 739-745.

THOMAS, K.B. et al., 2001. Antifouling paint booster biocides in the UK coastal environment and potential risks of biological effects. *Marine Pollution Bulletin*, v. 42, n° 8, p. 677-688.

TOMAR, R.S.; SHIAO, R. 2008. Early Life and Adult Exposure to Isoflavones and Breast Cancer Risk. *Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews*, v. 26, p.113-173.

TORRES, N.H. 2009. Monitoração de resíduos dos hormônios 17 $\alpha$ -etinilestradiol, 17 $\beta$ -estradiol e estriol em águas de abastecimento urbano da cidade de Piracicaba, SP. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, USP, 83f.

TORRES, N.H. et al., 2012. Fármacos no ambiente – revisão. *REA – Revista de estudos ambientais*, v.14, n° 4, p. 67-75.



TSUBOY, M.S.F. 2012. Efeito das isoflavonas da soja daidzeína e genisteína em células MCF-7, HB4a e OVCAR-3: Estudo da citotoxicidade, indução de apoptose, cinética de proliferação celular e expressão gênica. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista – UNESP, 154p.

TUBINO, R. 2007. Artisanal fisheries production in the coastal zone of Itaipu, Niterói, RJ, Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*, 55 (3).

TUCCI, C.E.M. 1998. Modelos Hidrológicos. Porto Alegre, ed. Da Universidade/UFRGS/ABRH, 669p.

UNEP - United Nations Environment Programme. 2006. Global Programme of Action for the Protection of the Marine Environment from Land-Based Activities (GPA). A guide for national action, The Hague; p.94.

UNDERWOOD, A. J.: 1989. "The analysis of stress in natural populations", *BioL J. Linn. Soc.* 37, 51-78

VAN DEN BELT, K. et al., 2004. Comparative study on the in vitro/in vivo estrogenic potencies of 17-estradiol, estrone, 17-ethynylestradiol and nonylphenol. *Aquatic Toxicology*, v. 66, p.183–195.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13, nº 2, p.57-149.

VAN, S. et al., 2019. World Porifera database. Accessed at <http://www.marinespecies.org/porifera>

VIALI, A.M. 2014. Avaliação da eficiência de remoção de hormônios em estações de tratamentos de efluentes. Trabalho Final de Curso, Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, 71f.

VIEIRA, C.S.M. 2007. Biologia alimentar do *Etmopterus pusillus* no Algarve. Dissertação de mestrado, Universidade do Algarve, p.83.

VOM SAAL, F.S., HUGHES, C. 2005. An extensive new literature concerning low-dose effects of Bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environmental Health Perspectives* v. 113, nº 8, p. 926-933.

WALKER, C.M. et al., 1996. *Principles of Ecotoxicology*, Bristol. PA: Taylor and Francis, 1996.

WANG, A. et al., 2018. Subtype dependent biomarker identification and tumor classification from gene expression profiles. <https://doi.org/10.1016/j.knosys.2018.01.025>

WANG, Q. et al., 2017. Bioaccumulation and biomagnification of emerging bisphenol analogues in aquatic organisms from Taihu Lake, China. *Science of the Total Environment*, v. 598, p.814-820.

- WANG, X. et al., 2017. Gestational and lactational exposure to di-isobutyl phthalate via diet in maternal mice decreases testosterone levels in male offspring. *Chemosphere*, v. 172, p. 260-267.
- WHALEY DA, KEYES D, KHORRAMI B. 2001. Incorporation of endocrine disruption into chemical hazard scoring for pollution prevention and current list of endocrine disrupting chemicals. *Drug Chem Toxicol.*, v.24, p. 359–420.
- WHITTEN, P.L.; PATISAUL, H.B. 2001. Cross-species and interassay comparisons of phytoestrogen action. *Environ. Health Perspect.*, v. 109, p. 5-20.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2003. Polychlorinated Biphenyls: Human Health Aspects. Concise International Chemical Assessment Document, 55, Geneva.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1999. Guidelines for drinking quality water. Geneva p.160-220.
- WHO - World Health Organization. Containing antimicrobial resistance. 2005. Geneva, Switzerland: WHO; (WHO Policy Perspectives on Medicines; 10).
- WOCLAWEK-POTOCKA, I. et al., 2005. Soy-bean derived phytoestrogens regulate prostaglandine secretion in endometrium during the estrous cycle and early pregnancy in cattle. *Experimental Biology and Medicine*, v. 230, p.189-199.
- WU, M.; JANSSEN, S. 2011. Dosed without prescription: preventing pharmaceutical contamination of our nation's drinking water. *Environ. Sci. Technol.*, v. 45, p.366–367.
- XIONG, Q. et al., 2015. Elevated Serum Bisphenol A Level in Patients with Dilated Cardiomyopathy. *Int J Environ Res Public Health*, v. 12, n° 5, 5329–5337.
- YAN, Z. et al., 2013. Interaction of 17-estradiol and ketoconazole on endocrine function in goldfish (*Carassius auratus*). *Aquatic Toxicology*, v. 132–133, p.19–25.
- ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. 2006. Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações. São Carlos, RIMA, 478p.
- ZHONG L. et al., 2014. Distribution of vitellogenin in Zebrafish (*Danio rerio*) tissues for biomarker analysis. *Aquatic Toxicology*, v. 149, p. 1-7.
- ZUBEY, G.L.; PARSON, W.W.; VANCE, D.E. 1995. Principles of Biochemistry. Wm. C. Brown Communications, Inc. Publishers, UK, 1995.
- ZUO, Y., ZHANG, K., DENG, Y. 2006. Occurrence and Photochemical Degradation of 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol in Acushnet River Estuary, *Chemosphere*, v. 63, p. 1583–1590.

## ANEXO A – Bioensaios realizados durante a pesquisa

Figura 35 - Ensaio piloto de exposição da esponja marinha *Hymeniacidon heliophila* (Wilson, 1911) ao hormônio sintético  $17\alpha$ -etinilestradiol e ao biocida Diuron na concentração de  $(5000 \text{ ng/l}^{-1})$  em diferentes tempos (10; 30; 60; 180; 360 min e 24 horas). A extração de RNA das amostras obtidas nesse experimento não pôde ser obtida, devido a um problema técnico no freezer de armazenamento contendo o material.

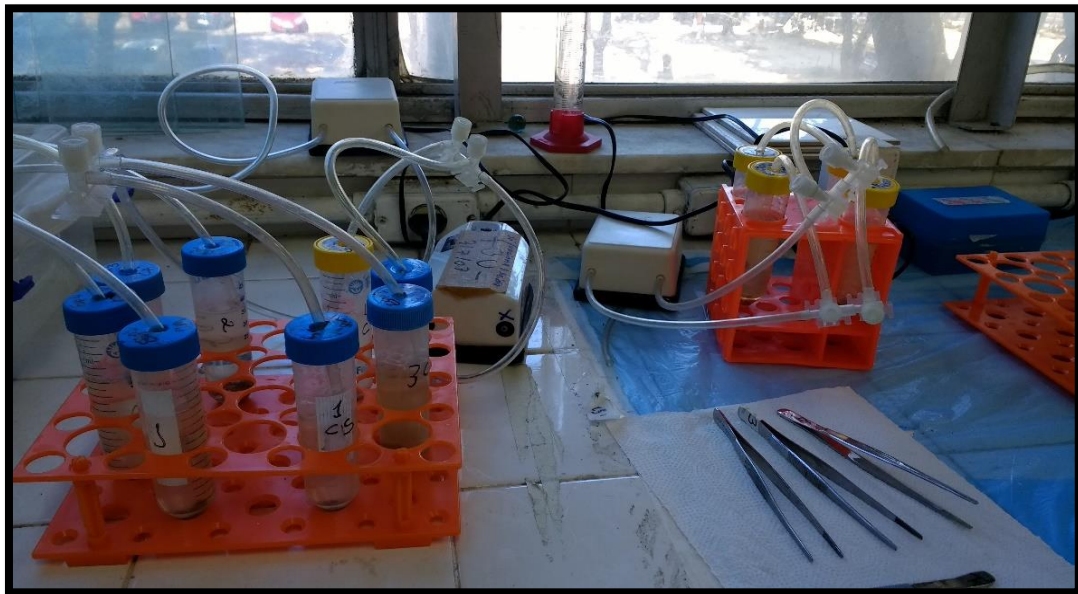
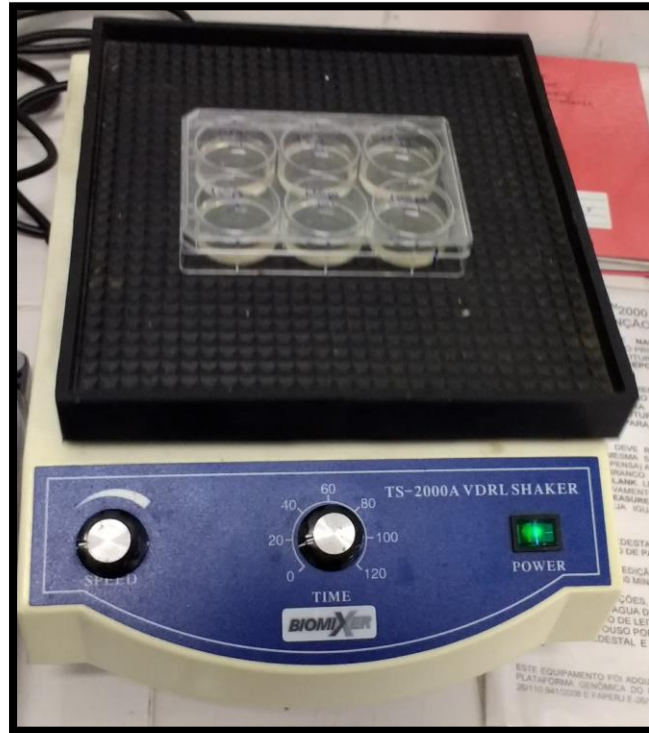


Figura 36 - Ensaio de exposição da esponja marinha *Hymeniacidon heliophila* (Wilson, 1911) ao biocida Diuron em diferentes concentrações: 80; 400; 2000 e 10000  $\text{ng/l}^{-1}$ , utilizando diferentes tempos de exposição (10; 40; 120 min e 24 horas).

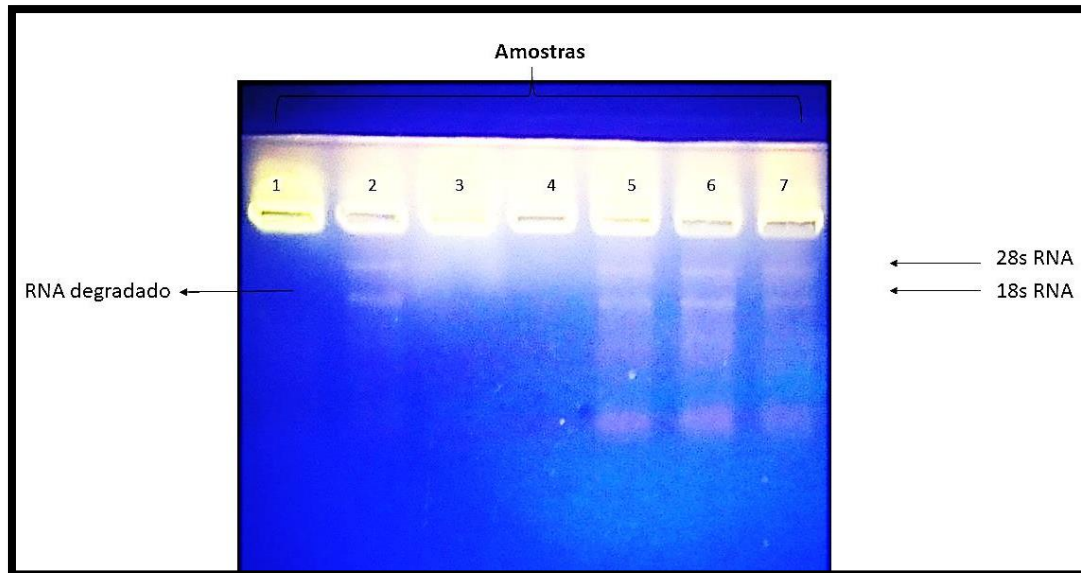


Figura 37 - Ensaio piloto com esponjas marinhas *Suberites aurantiacus* (Duchassaing & Michelotti, 1864) ao hormônio sintético  $17\alpha$ -etinilestradiol em diferentes concentrações: 15; 60; 150 e 600  $\text{ng/l}^{-1}$ , utilizando o tempo de exposição de 120 minutos, por meio da dissociação de células.



**ANEXO B** – Extrações de RNA realizadas ao longo da pesquisa.

Figura 38 - Extração de RNA utilizando o Kit Direct-zol RNA Plus™ (Sinapse) - amostras do segundo experimento (**MÉTODO I**) armazenadas a -80°C.



Legenda: Amostras – T0; CA10; SOL10; T110; T210; T310; T410.

Figura 39 - Extração de RNA das amostras do terceiro experimento (dissociação de células) armazenadas a -80°C, por meio do método do *Trizol* (Invitrogen®) – poço 1 ao 4, e por meio do Kit de extração Direct-zol RNA Plus™ (Sinapse) – poço 5 ao 8.

