Tatiane Sant'Ana Guimarães

DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS HORMÔNIOS SEXUAIS 17 B -
ESTRADIOL (E2), ESTRIOL (E3), ESTRONA (E1) E 17 A -ETINILESTRADIOL
(EE2) EM ÁGUA DE ABASTECIMENTO: ESTUDO DE CASO DA CIDADE DE
SÃO CARLOS, COM VISTAS AO SANEAMENTO AMBIENTAL

Dissertação apresentada ao programa de Pós-
Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento
da Escola de Engenharia de São Carlos,
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Mestre em Hidráulica e Saneamento.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ruth de Gouvêa Duarte

São Carlos, SP.

Março, 2008

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

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

G963d Guimarães, Tatiane Sant'Ana
Detecção e quantificação dos hormônios sexuais 17 B-
estradiol (E2), estriol (E3), estrona(E1) e 17 A-
etínilestradiol (EE2) em água de abastecimento : estudo
de caso da cidade de São Carlos, com vistas ao saneamento
ambiental / Tatiane Sant'Ana Guimarães ; orientador Ruth
de Gouvêa Duarte. -- São Carlos, 2008.

Dissertação (Mestrado-Programa de Pós-Graduação e Área
de Concentração em Hidráulica e Saneamento) -- Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
2008.

1. Hormônios sexuais. 2. Estrógenos. 3. Disruptores
endócrinos. 4. Saneamento do meio. 5. Água de
abastecimento. 5. Radioimunoensaio. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Tecnóloga **TATIANE SANT'ANA GUIMARÃES**

Dissertação defendida e julgada em 29/04/2008 perante a Comissão Julgadora:

Prof.^a Dr.^a **RUTH DE GOUVEA DUARTE (Orientadora)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovada

Prof. Associado **GERMANO TREMILOSI FILHO**
(Instituto de Química de São Carlos/USP)

APPROVADO

Prof. Dr. **JOSÉ SALIM**
(Universidade Federal do Rio Grande do Norte/UFRN)

APROVADA

Prof. Associado **MARCELO ZAIAT**
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Engenharia (Hidráulica e Saneamento)

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

O tempo

A vida é o dever que nós trouxemos para fazer em casa.

Quando se vê, já são seis horas!

Quando se vê, já é sexta-feira!

Quando se vê, já é natal...

Quando se vê, já terminou o ano...

Quando se vê perdemos o amor da nossa vida.

Quando se vê passaram 50 anos!

Agora é tarde demais para ser reprovado...

Se me fosse dado um dia, outra oportunidade, eu nem olhava o relógio.

Seguiria sempre em frente e iria jogando pelo caminho a casca dourada e inútil das horas...

Seguraria o amor que está a minha frente e diria que eu o amo...

E tem mais: não deixe de fazer algo de que gosta devido à falta de tempo.

Não deixe de ter pessoas ao seu lado por puro medo de ser feliz.

A única falta que terá será a desse tempo que, infelizmente, nunca mais voltará.

Mário Quintana

(1906-1994)

**À minha família – fonte inspiradora e
exemplo de amor incondicional – esta
dissertação dedico...**

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof^a Ruth de Gouvêa Duarte pela paciência, companheirismo e sabedoria;

Agradeço à minha família: aos meus irmãos Paula e André que sempre me incentivaram; à minha mãe Fátima pelo amor e incentivo; ao meu pai Paulo pelo apoio incondicional – amoroso, financeiro e tranquilizante;

Aos meus tios e tias, primos e primas que sempre me fizeram sentir importante...agradeço;

Ao Prof^o Luiz Romariz Duarte *in memoriam*, pelo exemplo e companheirismo;

Agradeço ao Departamento de Hidráulica e Saneamento/EESC, em especial aos funcionários Sá, Pavi, Rose e André pela ajuda;

Agradeço ao CNPq pela concessão da Bolsa auxílio;

Ao IQSC, ao Prof^o Germano Tremiliosi Filho, aos funcionários, em especial ao Paulo do CAQI, e às alunas Renata (graduação e IC) e Janete (pós-graduação) pela ajuda;

Agradeço em Especial à Prof^a Eny Maria Vieira, que muito ajudou desde o início da pesquisa, com suporte técnico e científico;

Agradeço à UNIMED São Carlos, em nome de Mozart Maluf; ao Dr. Adriano Del Vale e Maria Bernasconi do Unilab;

Ao Dr. José Carlos Bailone pelas conversas e material;

Agradeço SAAE São Carlos, em especial ao Sr. Luis Barbosa, também à Renata e Isabela;

Agradeço à Márcia Damianovic pelo auxílio na segunda qualificação;

Agradeço às minhas companheiras de casa durante os 3 anos que residi em São Carlos: Maria Fernanda, Michele, Lúgia e Fabiana, pela compreensão e bons momentos (festas, almoços, Pão de queijo, cafês, conversas, risadas...)

À Rita Libutti Escrivão, amiga e a família: Olavo, Vítor, Otávio, Terezinha e Miguel;

Agradeço aos amigos do Ecoclube que me apoiaram e compreenderam minha ausência;

Agradeço ao Roberto – o primeiro a dizer que deveria fazer o mestrado “aqui” e depois a falar para desistir de tudo isso – um dos motivos de não desistir jamais!

A todos com quem tomei um chimarrão, cerveja, vinho, cachaça ou café.

Em especial à Bassani pelas refeições, os bons vinhos, mate com pipoca e conversas...

Sobre tudo, agradeço a Deus que sempre esteve ao meu lado nos mais distintos momentos; por toda Luz e toda Coragem, Fé e Perseverança!

Guimarães, T.S. Detecção e Quantificação dos hormônios sexuais 17 β -estradiol (E2), estriol (E3), estrona (E1) e 17 α -etinilestradiol (EE2) em água de abastecimento: estudo de caso da cidade de São Carlos, com vistas ao saneamento ambiental. 2008. Dissertação (Mestrado). EESC/USP, São Carlos, 2008.

Um dos grandes problemas da Engenharia Ambiental é a contaminação dos corpos hídricos. Os sanitaristas têm se preocupado com os hormônios sexuais, notadamente os estrógenos, compostos extremamente ativos biologicamente, que têm sido referidos como agentes etiológicos de feminilização e de vários tipos de cânceres. Os estrógenos naturais 17 beta-estradiol (E2), estriol (E3), estrona (E1) e o sintético 17 alfa-etinilestradiol (EE2), desenvolvidos para uso médico em terapias de reposição hormonal feminina e métodos contraceptivos, são os que despertam maiores preocupações, pela contínua introdução ao ambiente; hormônios que possuem a melhor conformação reconhecida pelos receptores que resultam respostas máximas, por isso são considerados responsáveis pela maioria dos efeitos disruptores desencadeados pela disposição de efluentes. A mudança de padrões quanto à atividade sexual dos jovens e a preocupação com o planejamento familiar, levaram ao grande consumo de contraceptivos que, através da urina, são levados pela rede coletora aos corpos de água. O indiscriminado uso desses hormônios na bovinocultura, suinocultura, avicultura e aquicultura são responsáveis por parte considerável desse contaminante nos mananciais. Os hormônios excretados através da urina e fezes e agentes provenientes das indústrias de processamento de alimentos preocupam os sanitaristas porque o lançamento de efluentes *in natura* ou tratados, são as principais vias de contaminação do ambiente aquático, quer pelo déficit de infra-estrutura em saneamento, quer pela ineficiência tecnológica e/ou operacional na remoção desses compostos nas estações de tratamento de água ou de efluentes. Apesar de possuírem meia-vida relativamente curta, quando comparados a outros compostos orgânicos como praguicidas, os estrógenos naturais são continuamente introduzidos no ambiente, o que lhes confere caráter cumulativo. A proposta desta pesquisa foi verificar a presença de estrógenos na água bruta que chega à Estação de Tratamento de Água, após seu tratamento, em água tratada por osmose reversa e por tecnologia *Milli Q*®. Para verificar e quantificar presença desses hormônios estrógenos em água de abastecimento de São Carlos-SP, foram realizadas exames através de Imunoensaio Quimiluminescente e Radioimunoensaio. Os resultados apontaram que a ETA não possui solução eficiente para a remoção dos analitos de interesse dessa pesquisa, uma vez que na água tratada foram encontrados valores semelhantes aos da água bruta.

Palavras-chave: hormônios sexuais, estrógenos, disruptores endócrinos, saneamento do meio, água de abastecimento, Radioimunoensaio.

Guimarães, T.S. Detection and Quantification of sexual hormones 17 β - estradiol (E2), estriol (E3), estrone (E1) and 17 α - etinilestradiol (EE2) in supplying water: study of case of the city of São Carlos, with sights to the environmental sanitation. 2008. Dissertation (Master Degree). EESC/USP, São Carlos, 2008.

One of the major problems of Environmental Engineering is the water contamination. The sanitary persons have been concerned with the gonadal hormones, notably the estrogen, biologically active compounds extremely, which have been referred to as etiologic agents of feminization and several types of cancers. The natural estrogen 17 beta-estradiol (E2), estriol (E3), estrone (E1) and synthetic 17 alpha-ethinylestradiol (EE2), developed for medical use of hormone replacement therapy in women and contraceptive methods, are those that attract larger concerns by the continuous introduction into the environment; hormones that have the best conformation recognized by receptors that result answers maximum, so they are considered responsible for most of the effects disruptors triggered by the wastewater disposal. The change in patterns on the sexual activity of young people and the concern with family planning, led to the large consumption of contraceptives that, in the urine, are led by the distribution net to water. The indiscriminate use of these hormones in cattle, pigs, poultry and aquaculture are responsible for part of this contaminant in the source. The hormones excreted in the urine and feces and agents from the food processing industries in the sanitary concern that the launch of effluents in nature or treated, are the main routes of contamination of the aquatic environment, either by lack of infrastructure, sanitation, or by inefficiency technological and / or operating in the removal of these compounds in the treatment plants, water or effluent. Despite having relatively short stocking-lige when compared to other organics such as pesticides, natural estrogens are continuously released into the environment, which gives them character cumulative. The proposal of this research was to verify the presence of estrogen in the gross water that arrives at the Water Treatment Plant, after the treatment, in water treated by reverse osmosis and by Milli Q® technology. To verify and quantify presence of these hormones estrogen in water supply of San Carlos-SP, examinations were conducted through Immunoassay Chemiluminescent and Radioimunoassays. The results showed that the ETA has no efficient solution for removal of interest analytes of this research, because in the treated water were found values similar to crude water.

Key-Words: sexual hormones; estrogens; endocrines disruptors; sanitation; drink water; Radio Immuno Assay

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEAT: Centro Empresarial de Alta Tecnologia

CDL: Centro de Diagnóstico Laboratorial

CRIESP: Centro de Radioimunoensaio de São Paulo

DDT: Dicloro-Difenil-Tricloroetano

DES: Dietilestilbestrol

EDC: Disruptor Endócrino Químico

EESC: Escola de Engenharia de São Carlos

ETA: Estação de Tratamento de Água

ETE: Estação de Tratamento de Esgoto

E1: Estrona

E2: Estradiol

E3: Estriol

EE2: Etinilestradiol

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada

LC-MS: Cromatografia líquida acoplada a Espectrometria de massas

PC: Policarbonato

PCB: Policloretos Bifenilos

POP: Poluentes Orgânicos Persistentes.

pH: Potencial Hidrogeniônico

PPCP: Produtos de cuidados pessoais

PVC: Cloreto de polivinila

RIA: Radio Imuno Ensaio

RLU: Unidade relativa de luz

rpm: Rotação por minuto

SHBG: Globulina transportadora de hormônios sexuais

TSH: Hormônio estimulante da tireóide

SAAE: Serviço Autônomo de Água e Esgoto

SHS: Departamento de Hidráulica e Saneamento

UFC: Unidade formadora de colônia

UNIMED: Cooperativa Médica de São Carlos

UNT: Unidade nefelométrica de turbidez

LISTA DE UNIDADES

g/mol: Gramas por Mol

ng/L: Nanogramas por litro

ng/mL: Nanogramas por mililitro

pg/mL: Picogramas por mililitro

RLU: Unidade relativa de luz

Rpm: Rotação por minuto

μL: Micro litros

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

Figura 1:	Estrutura Química dos Hormônios Estrógenos	10
Figura 2:	Entrada da água bruta – ETA	24
Figura 3:	Racks wizard	28
Figura 4:	Esquema do funcionamento da ETA	32

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1.	Agentes Químicos com atividades estrogênicas	12
Quadro 1:	Concentrações de fármacos e hormônios sexuais em amostras coletadas em diferentes ecossistemas	16
Quadro 2:	Concentrações de fármacos em água potável – EUA	17
Tabela 2.	Resultados CDL	33
Tabela 3.	Teste 1	33
Tabela 4.	Análise Bacteriológica	34
Tabela 5.	Análise Físico-Química	34
Tabela 6.	Resultados Estrona	35
Tabela 7.	Resultados Estradiol	35
Tabela 8.	Resultados Estriol	35
Tabela 9.	Resultados amostras dopadas	36
Gráfico 1.	Estrona	36
Gráfico 2.	Estradiol	37
Gráfico 3.	Estriol	37

SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VIII
LISTA DE SIGLAS	X
LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS E QUADROS	XI
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. HIPÓTESE–TEMA E PROPOSTA	3
3. OBJETIVOS	4
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
4.1. Conceitos de Disruptores Endócrinos Químicos (EDC)	5
4.2. Breve Histórico dos esteróides	6
4.3. Outros usos e efeitos	7
4.4. Drogas para humanos e veterinárias; produtos de cuidados pessoais.	15
4.4 Tratamento de Água	19
5. MATERIAIS E MÉTODOS	22
5.1. Materiais e equipamentos	22
5.2. Determinações analíticas experimentais	22
5.3. Metodologia Geral	24
5.4. Dinâmica do trabalho	25
5.5. Estradiol	25
5.5.1. Calibração da curva-mestre	26
5.5.2. Características do desempenho	26
5.5.3. Sensibilidade e Faixa de Teste	26
5.5.4. Padronização	27

5.6. Estrona e Estriol	27
5.6.1. Kit DSL-3700	28
5.6.2. Precisão	29
5.6.3. Kit Estrona DSL 8700®	29
5.6.4. Sensibilidade	29
5.7. Análise dos Dados	29
6. A CIDADE DE SÃO CARLOS	31
6.1. A Estação de Tratamento de Água de São Carlos	31
7. RESULTADOS	33
7.1 Resultados preliminares determinados no primeiro pré-teste realizado no Laboratório CDL	33
7.2. Resultados determinados no pré-teste, realizado no laboratório UNILAB e no Apoio CRIESP	33
7.3. Resultados	34
7.3.1. Qualidade da Água – Data de Coletas	34
7.3.2. Resultados determinados no laboratório UNILAB e no Apoio CRIESP	35
7.4. Teste de Kruskal – Wallis, via <i>software</i> R.	38
8. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXO A - Equipamentos e Padronização	46
ANEXO B – Pontos de Coleta	48
ANEXO C – Procedimentos	50
ANEXO D – Laudos UNILAB e CRIESP	55
GLOSSÁRIO	83

Nada é veneno, tudo é veneno.

A diferença está na dose.

Paracelsus

(1493-1541)

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Um dos palpitantes debates científicos internacionais da última década – motivados pela saúde ambiental e saúde pública – dizem respeito à presença no meio ambiente de um grupo específico de compostos químicos cujos efeitos biológicos são caracterizados pela capacidade de simular ou alterar a atividade hormonal dos animais, incluídos os seres humanos.

Essas substâncias, conhecidas como Disruptores Endócrinos Químicos, que simulam a ação dos hormônios naturais, podem perturbar o sistema endócrino e inibir ou alterar as funções regulares normais dos sistemas imunológico e nervoso central.

Paralelamente aos problemas, os equipamentos de detecção têm sido aprimorados e a cada vez é melhor conhecida a problemática de poluentes de toda ordem, inclusive fármacos como antibióticos, bactericidas, estrógenos, progestógenos.

Os hormônios sexuais, excretados através da urina e fezes de humanos e de outros animais, ou provenientes das indústrias de processamento de alimentos, preocupam os sanitaristas porque o lançamento de efluentes *in natura* ou tratados, são as principais vias de contaminação do ambiente aquático quer pelo déficit de infraestrutura em saneamento, quer pela não eficiência tecnológica e/ou operacional das estações de tratamento de água ou de efluentes em remover esses hormônios.

Os estrógenos considerados fisiologicamente mais importantes são o estradiol, o estriol e a estrona. Apesar de possuírem meia-vida relativamente curta – quando comparados a outros compostos orgânicos, como praguicidas – os estrógenos naturais são continuamente introduzidos no ambiente, o que lhes confere caráter cumulativo.

Por motivos de saúde ambiental e pública, é importante a detecção e quantificação dessas substâncias no ambiente, pois seus possíveis efeitos são de alto interesse médico, sanitário e de pesquisa. Para avaliar o risco potencial desses hormônios é preciso detectar e documentar, na diversidade dos ecossistemas, a exposição ambiental a eles. Essa detecção é tarefa difícil em função da complexidade dos ecossistemas e da baixa concentração com que se apresentam no ambiente.

A proposta deste trabalho é, com essa avaliação, verificar a presença desses hormônios por meio de sua detecção na fonte de captação, na água bruta que chega a ETA e na água após tratamento a ser distribuída à população da cidade de São Carlos.

2. HIPÓTESE–TEMA E PROPOSTA

No Brasil, as Estações de Tratamento de Água (ETAs) não têm por rotina detectar a presença de fármacos, como hormônios, por exemplo, de onde haver grande probabilidade de a água de abastecimento conter, entre outros, compostos hormonais.

Proposta: Verificar se é quantificável a possível presença de estrógenos* (hormônios sexuais) pela metodologia de Radioimunoensaio e Quimiluminescência; e em que teores são encontrados na água bruta que chega à ETA; na água pós-tratamento, água tratada por osmose reversa e por tecnologia *Milli Q*®. A meta é saber se o tratamento clássico retém hormônios da água bruta e verificar se a água que chega aos domicílios está isenta desse tipo de contaminação, dado seu potencial poder de negativamente interferir no organismo por sua conformação reconhecida pelos receptores que resultam respostas máximas – por isso considerados como responsáveis pela maioria dos efeitos disruptores desencadeados pela disposição de efluentes.

*Os termos assinalados com asteriscos constam no Glossário em anexo, página 83

3. OBJETIVOS

Detectar a presença e quantificar os hormônios sexuais/esteróides 17β - estradiol (E2), estriol (E3), estrona (E1) e 17α - etinilestradiol (EE2) em água bruta do Córrego do Feijão e do Espraiado; em água de abastecimento proveniente da ETA de São Carlos, SP; água tratada por osmose reversa e por tecnologia *Milli Q*®, pela técnica de Radioimunoensaio e Quimiluminescência, para fornecer subsídios aos sanitaristas responsáveis pela saúde ambiental e pública.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Conceitos de Disruptores Endócrinos Químicos (EDC)

EDC é a sigla, em inglês, de Disruptores Endócrinos Químicos, nome dado às substâncias exógenas* que causam efeitos adversos à saúde de um organismo ou que são progênios secundários que alteram a função endócrina* e interferem em sua homeostase* e em seu processo de desenvolvimento. (KAVLOCK et al. 1996).

Qualquer substância que possa alterar fisiologicamente as funções de uma variedade de hormônios endógenos como estrogênio* e androgênio*, são ditos disruptores endócrinos químicos. Essas substâncias produzem no organismo os mesmos efeitos que os hormônios sexuais porém, não são dotados de uma mesma estrutura.

Essa terminologia – disruptores endócrinos químicos – foi definida no seminário europeu sobre o Impacto dos desreguladores endócrinos na saúde humana e na vida selvagem, realizado no Reino Unido (EUR 1996): "Um desregulador endócrino é uma substância exógena que provoca efeitos adversos à saúde em um organismo saudável, ou em seus descendentes, com conseqüentes alterações na função endócrina"; também definido como “um potencial desregulador endócrino é uma substância que possui propriedades que podem provocar desregulação do sistema endócrino em um organismo saudável”.

*Os termos assinalados com asteriscos constam no Glossário em anexo página 83.

Skakkebaek (1998), refere que disruptores endócrinos podem ocorrer em diversos níveis. A síntese, o transporte, o metabolismo e a excreção dos hormônios podem ser alterados por substâncias tóxicas. Bem por isso, muita atenção tem sido dada à direta ação hormonal sinérgica ou antagônica de agentes ambientais. As propriedades estrogênicas e androgênicas dos compostos são cruciais para a diferenciação sexual. Assim, compostos anti-androgênicos e estrogênicos tendem a desmasculinizar/feminilizar um indivíduo, e compostos andrógenos têm efeito oposto. Alguns destes compostos estão presentes em nosso meio, inclusive em nossa dieta.

De acordo com Preziosi (1998), os EDCs podem ser produtos naturais de animal; ter origem vegetal, como os fitoestrógenos produzidos pela própria planta; podem, também, ser compostos químicos sintéticos, em sua grande maioria organoclorados, com os mais variados usos industriais, comerciais e domésticos produzidos intencionalmente – caso dos solventes clorados e de inseticidas – para atuar seletivamente sobre o sistema endócrino de insetos específicos.

Essas substâncias, de origem antropogênica, geralmente são persistentes no ambiente; por acumularem-se no solo e nos sedimentos, elas são facilmente transportadas por lixiviação para outras regiões, percorrem a cadeia trófica e, por consequência, causam danos maiores aos indivíduos do último nível trófico ou do topo da cadeia alimentar, constituída por poucos indivíduos, porém de porte grande.

4.2 Breve Histórico dos esteróides

O mais danoso evento de EDC aconteceu em 1940-1971, quando o estrógeno sintético dietilestilbestrol* (DES) foi prescrito para 2 a 3 milhões de mulheres grávidas para prevenir aborto e sanar certas complicações da gravidez.

Em 1970 foram relacionados casos de carcinomas vaginais em mulheres jovens em função do uso de DES por suas mães durante o primeiro trimestre da gravidez.

Os efeitos do DES parecem ser partilhados por todos os estrogênios. No entanto, muitos dos estrogênios sintéticos são eficazes em doses mais baixas do que o estradiol, porque eles não estão vinculados à Globulina (SHBG) que, normalmente, ligam aproximadamente 95% do Estradiol circulante, tornando-o biologicamente inativo. (ARAI et al., 1983).

As razões para aumento da incidência de criptorquidia, hipospadia e câncer testicular são desconhecidas, mas dados experimentais demonstram que esteróides sexuais têm importante papel na fisiologia de distúrbios testicular e uretral; sinalizam também para a possibilidade de os fatores ambientais poderem causar problema de interferência com esteróides sexuais. O melhor exemplo desse tipo de influência é do DES, extensivamente estudado em seres humanos e animais de laboratório. (LARSEN et al., 2003)

Outros estrogênios sintéticos, como o etinilestradiol* (EE2) e o estradiol* (E2), também foram cuidadosamente estudados em várias cobaias animais devido às suas aplicações farmacêuticas (ARAI et al., 1983).

4.2 Outros usos e efeitos

Existe quatro tipos de estrogênios: os que ocorrem naturalmente no organismo; os que são sintetizados para serem ingeridos como medicamento; os xenoestrogênios ou externos, produzidos pelas modernas indústrias químicas e presentes em produtos de uso doméstico; e os fitoestrogênios presentes em plantas alimentícias, muitos dos quais promovem importantes benefícios à saúde. Os xenoestrogênios – são uma série de

substâncias químicas tóxicas produzidas pelo homem que confundem os receptores celulares dos estrogênios no organismo, e interferem em suas mensagens bioquímicas naturais; podem ser compostos tipo estrogênios ou terem a habilidade de mimetizar ou bloquear a atividade dos hormônios naturais; também podem alterar a forma como os hormônios e seus receptores protéicos são desenvolvidos e metabolizados em sua atuação. (LARSEN et al., 2003)

De acordo com o mesmo autor, os hormônios* sexuais produzidos a partir do colesterol podem ser classificados em três grupos principais: hormônios sexuais femininos ou estrógenos, hormônios sexuais masculinos ou andrógenos, e hormônios de gravidez ou progestógenos.

Apenas três estrogênios estão naturalmente presentes em quantidades significativas: estradiol, estrona* e estriol*. De acordo com Zink(1988), o estradiol é o hormônio estrogênico mais abundante e o mais potente; degrada-se facilmente à estrona por ação de uma dehidrogenase específica. Possui peso molecular de 272,37 g/mol; é doze vezes mais potente que o estrona e oitenta mais do que o estriol, um derivado do estrona. O estriol, com peso molecular de 288,37 g/mol, é um produto metabólico e de excreção de estradiol e da estrona, com fraco efeito estrogênico. A estrona é formada primeiramente no organismo animal juntamente com o estradiol; peso molecular de 288,37 g/mol. O etinilestradiol com peso molecular de 296,41 g/mol, possui uma substituição em H^+ em C_{17} do estradiol por um grupo etinilo ($-C \equiv CH$), com deterioração biológica.

Os estrogênios são encontrados em “boas” e “más” formas; as “más” podem desencadear câncer. O organismo busca manter ótimos níveis dessas substâncias no sangue, através de respostas das glândulas hipotálamo e pituitária em níveis baixos;

estimulam os ovários femininos a secretarem estradiol e progesterona e os testículos masculinos a secretarem testosterona que, em excesso, transforma-se em estrogênios, até que certo nível sanguíneo seja alcançado. (DAVIS, 1995)

Noppe et al. (2004) referem que os componentes 17β - estradiol (E2) e estrona (E1) são hormônios sexuais femininos produzidos por humanos, por outros mamíferos e por vertebrados. Esses estrógenos são lipofílicos, moléculas *fat soluble*. Estudos indicam a probabilidade de a degradação demorar apenas alguns dias se as circunstâncias forem ótimas ou poderá ser bastante lenta em condições desfavoráveis. (LÓPEZ de ALDA & BARCELÓ, 2001)

No início dos anos sessenta, foram propostas alterações para produzir uma segunda geração, mais seguras, de pílulas anticoncepcionais mais seguras, o etinilestradiol. Elas, na verdade conectam-se aos receptores estrogênicos naturais na mama e são quarenta vezes mais potentes do que o estradiol. (LARSEN et al., 2003)

Muitos efeitos no sistema reprodutivo de organismos aquáticos, como a feminização de peixes machos expostos a efluentes de ETE, têm sido atribuídos à presença de substâncias estrógenas ativas, (TILTON et al., 2002). Substâncias estrogênicas, que incluem esteróides naturais e sintéticos e fitoestrógenos, pertencem a uma classe de compostos definidos não por estrutura química, mas por efeito biológico. A ligação das causas e suas contribuições a potenciais efeitos estrogênicos têm alcançado matrizes ambientais. (HEISTERKAMP et al. 2003)

Todos esses compostos têm estrutura policíclica com um grupo hidroxila (-OH) em C₃, um grupo - CH₃ em C₁₃ e diferentes substituintes em C₁₇; ademais, estes componentes podem ser biologicamente degradados (Figura 1). Vários estudos têm detectado baixas concentrações desses compostos, da ordem de nanograma por litro;

mas essas concentrações são significativas para disruptores endócrinos. Peixes machos expostos a pequenos níveis de nanogramas por litro desses estrógenos, deram respostas estrogênicas como produção de vitelogenina (VTG, proteína específica de fêmeas), mudança de sexo e presença de oócitos. (NOPPE et al. 2004)

Fig. 1: Estrutura Química dos Hormônios Estrógenos.

Fonte: Reis Filho et al. 2005

Segundo Colborn et al. (1997), muitos dos perturbadores hormonais organoclorados, produzidos pela reação do gás cloro com hidrocarbonetos do petróleo, são utilizados em polímeros, agrotóxicos, solventes, agentes de branqueamento para roupas, papel em refrigeração e outros. Diversos produtos também contêm esses disruptores, incluindo: cloreto de polivinila/PVC e policarbonatos/PC, ambos encontrados em mamadeiras para bebês, brinquedos infantis; filmes para embalar alimentos e garrafas de água mineral; PCB's (*Policloreto de bifenilos*), estão presentes em medicamentos, roupas, alimentos, alvejantes domésticos, produtos de higiene pessoal como cosméticos, perfumes,

antitranspirantes, sabonetes, cremes dentais e higienizadores bucais; em agrotóxicos e herbicidas como Dicloro-Difenil-Tricloroetano(DDT), dieldrin, aldrin, hepacloro etc.

A ocorrência de disruptores endócrinos químicos no ambiente, sua persistência e os danos que podem causar, têm contribuído para aumentar a consciência de que os animais, inclusive o *Homo sapiens sapiens*, podem ser adversamente atingidos por diversas patogenias, desordens do trato reprodutivo, redução do número de espermatozóides e redução da fertilidade e, até mesmo, cânceres. (SNYDER et al 2001)

Existe uma crescente lista de poluentes ambientais tóxicos que possuem baixa atividade estrogênica. No entanto, sabe-se pouco sobre os seus possíveis efeitos aditivos ou sinérgicos; alguns efeitos organizacionais podem ocorrer na exposição a níveis mais baixos do que o esperado. (NAGEL et al., 1997). Nos animais, muitos transtornos reprodutivos têm sido associados aos efeitos xenoestrogênicos sobre o feto.

Atualmente, não podemos avaliar plenamente os possíveis riscos associados a componentes individuais quanto a efeitos adversos sobre a diferenciação sexual humana, embora haja extensa literatura disponível a partir de experiências com animais. Muitos dos compostos listados na Tabela 1 são usados em larga escala por seres humanos, portanto, potencialmente expostos a vários produtos químicos no seu cotidiano. A elevada exposição humana a alguns dos produtos químicos, por exemplo, bisfenol A, é tão alta quanto os níveis que causam efeitos reprodutivos adversos em animais de laboratório.

Tabela 1. Agentes Químicos com atividade estrogênica.

<i>Disruptores Endócrinos</i>	<i>INSETICIDAS</i>	<i>FITOESTRÓGENOS</i>	<i>Químicos industriais e Poluentes</i>	<i>Micoestrógenos</i>
	Clordecone(kepone)	Coumestrol	Aroclor 1221(PCB)	Zearalemome
	DDT	Daidzen	Bisfenol A	Zearalenol
	Dieldrin	Genistein	Butilbenzilftalato	
	Endosulfan	Sitosterol	Nonilfenol	
	Metoxuclor		Octilfenol	

Por serem lentamente degradados, esses agentes químicos rapidamente chegam à água e ao ar e passam a integrar os tecidos vivos; são excretadas em baixas quantidades, são lipossolúveis e acumulam-se nos tecidos gordurosos, no cérebro, no aparelho reprodutor e em vários órgãos. Grandes volumes dessas substâncias acumulam-se na cadeia alimentar e atingem altas concentrações no nível trófico dos seres que se alimentam de animais como os humanos e outros mamíferos e, também dos pássaros e répteis. Em uma espécie de gaivota da região dos Grandes Lagos, entre EUA e Canadá, os xenoestrogênios – Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) – encontravam-se em concentrações vinte cinco milhões de vezes acima daquelas encontradas nos sedimentos. (COLBORN et al., 1997)

Os POPs alteram as principais funções dos estrogênios e androgênios, podem desencadear déficit na saúde da reprodução e do desenvolvimento dos seres vivos – evidenciadas por pesquisas feitas com cobaias de laboratório, em culturas de células, na vida selvagem e com humanos. Theo Colborn et al.(1997), refere ter identificado 51 famílias de produtos sintéticos que geram distúrbios no sistema endócrino, ou hormonal, incluindo 209 policloreto bifenílicos, 75 dioxinas e 135 furanos.

Esses produtos além de estarem globalmente à queda de 50% no número de espermatozóides humanos, globalmente, entre os anos de 1938 e 1990, também são responsáveis por alterações no comportamento sexual; em depressão imunológica; à deformidades genitais; cânceres de mama, ovários, útero, de próstata e testicular; e pode provocar desordens neurológicas. Também há suspeita que POPs sejam causadores de fibrose cística da mama, síndrome ovariana policística, endometriose, fibróides uterinas e doenças inflamatórias pélvicas. Estes problemas podem ser influenciados por exposições, crônicas ou de desenvolvimento, através do ciclo da vida.

Estrógenos atingem o meio ambiente diretamente ou depois de passarem por uma Estação de Tratamento de Esgotos (ETE) com processos não eficientes para removê-los. Presentes nos ecossistemas podem chegar a mananciais de água superficial, a seus sedimentos, à matéria em suspensão e a organismos aquáticos. Ademais, estrógenos naturais, esteróides sintéticos, grupo que principalmente constitui contraceptivos* orais – usados como contraceptivos e na terapia de reposição hormonal na menopausa – têm sido referidos como poluentes ambientais. De acordo com Noppe et al. (2004), o componente sintético 17 α -etinilestradiol (EE2) é o principal componente ativo de pílulas anticoncepcionais de largamente usada por mulheres em idade fértil.

Isso permite hipotetizar que a ocorrência dessas substâncias esteja ligada ao declínio da produção de espermatozóides, ao aumento de incidência de câncer de mama e testicular e à puberdade precoce em humanos. (SHARPE, 1998 e DANISH, EPA, 2001)

Um estudo realizado por Auger et al. (1995) mostra declínio na qualidade do espermatozóide na população mundial, durante os últimos 50 anos. A partir de 1973, os autores mediram o volume de líquido seminal, a concentração espermática, e as percentagens de mobilidade em espermatozóides morfolologicamente normais em 1351 homens saudáveis e férteis. Os dados relativos ao sêmen foram colhidos de amostras de espermatozóides de um

banco em Paris e analisados, ano a ano, em função do ano de doação, da idade de cada paciente, do ano de nascimento e da duração da abstinência sexual antes da coleta de sêmen.

A concentração média de espermatozóides diminuiu 2,1% por ano, de 89×10^6 por mililitro em 1973 para 60×10^6 por mililitro em 1992. Durante o mesmo período as percentagens de espermatozóides normais e de sua mobilidade diminuíram 0,6% e 0,5% ao ano, respectivamente. Após o ajustamento em análises de regressão múltipla para a idade e a duração de abstinência sexual, para cada ano de nascimento, passou a representar a concentração de 2,6% ao ano no declínio da concentração espermática e de 0,3% e 0,7%, respectivamente, do declínio verificado no ano de percentagens de móveis e espermatozóides normais. Os autores concluíram que, durante os últimos 20 anos houve declínio na concentração e mobilidade dos espermatozóides e no percentual de espermatozóides morfolologicamente normais em homens férteis, independente da idade.

Em vários centros europeus, estudos mostraram que as mais dramáticas alterações foi o aumento da incidência do câncer testicular e a diminuição da qualidade de sêmen (TOPPARI et al., 1996). Moléstias testiculares, como hipospadia*, estão intimamente associadas ao distúrbio de diferenciação sexual fetal; cancro testicular, sêmen e qualidade também são influenciados por eventos fetais.

Diferenciação sexual é função da ação normal de hormônios reprodutivos, mais notadamente os androgênios, cuja presença é necessária para determinar o desenvolvimento do sexo masculino e sua ausência é importante para o desenvolvimento feminino. Taxas de desequilíbrio andrógeno/estrogênio são razões que podem perturbar a diferenciação sexual. Ambientes contaminados podem perturbar o equilíbrio hormonal do feto e, portanto, são referidos como desreguladores endócrinos.

A diferenciação sexual de animais de laboratório pode ser perturbada se na fase fetal forem expostos a compostos que tinham relações com atividade de esteróides sexuais ou que alteram níveis hormonais endógenos. A diferenciação sexual anormal nos animais selvagens expostos a substâncias tóxicas ambientais tem dado provas de que desreguladores hormonais ambientais podem interferir em seu desenvolvimento. Dados epidemiológicos demonstram que os fatores ambientais, incluindo estilo de vida, muito provavelmente têm contribuído para problemas em saúde reprodutiva, ainda que diretamente não tenham sido estabelecidas relações causais. Vários relatórios indicam aumento prevalente de ocorrências de criptorquidia* e hipospadia; embora a maioria dos estudos seja baseado em registro de dados, eles têm certas limitações. (TOPPARI et al., 1998)

4.4 Drogas para humanos, para animais e produtos de cuidados pessoais.

Muitos estudos mostram a presença de drogas no ecossistema aquático, especialmente em conexão com água para abastecimento. O quadro 1 sumariza as concentrações de fármacos no ano de 2002. Concentrações de 95 contaminantes orgânicos na água, incluindo muitos contaminantes ambientais preocupantes, foram quantificados em amostras de 139 córregos em 30 estados – de diferentes países – escolhidos de acordo com suas suscetibilidades à contaminação; foi levada em conta a intensa urbanização e a produção agropecuária.

Matriz (Local)	Compostos	Concentração (ng/L ou ng/g)
Água de Abastecimento		
Alemanha	Fármaco Phenazona	<5-900
Alemanha	<u>Estrógenos naturais e sintéticos</u>	<0.1-2.1
Alemanha	Ácido Clorídrico	<5-170
Reino Unido	<u>Estrógenos sintéticos/</u> <u>progestógeno</u>	<1-10
Água subterrânea		
Alemanha	60 fármacos	1.8-1100
Alemanha	18 antibióticos	<20-470
Alemanha	13 fármacos	n.d.-7300
Água de Rios		
Alemanha	18 antibióticos	<20-6000
Alemanha	32 drogas	<10-4100
Alemanha	<u>Estrógenos naturais e sintéticos</u>	<0.1-5.1
Reino Unido	<u>Estrógenos naturais e sintéticos</u>	<0.2-17
Reino Unido	<u>Estrógenos sintéticos/</u> <u>progestógeno</u>	2-17
Espanha	<u>Estrógenos e progestógeno</u>	0.2-71.1
Estados Unidos	Antibióticos	14-100
Estados Unidos	Drogas prescritas	7-260
Estados Unidos	Drogas não-prescritas	9-80
Estados Unidos	<u>Esteróides e hormônios</u>	5-2000
Canadá	<u>Esteróides</u>	2-67
Água Marinha/Estuário		
Mar do Norte	Fármacos ácidos/ neutros	<0.002-18.6
Sedimentos de Rio (Alemanha)	<u>Estrógenos naturais e sintéticos</u>	<0.2-1.5
Sedimentos de Rio (Espanha)	<u>Estrógenos e progestógeno</u>	0.05-22.8
Sedimentos Marinhos (EUA)	Drogas bactericidas	<0,2-1.7 µg/g
Lodo Ativado e digerido (Alemanha)	<u>Estrógenos naturais e sintéticos</u>	<2-49
Lodo Ativado (Israel)	<u>Estrógeno</u>	19-64
Biota		
Truta arco-íris (Suécia)	<u>Estrógenos naturais e sintéticos</u>	<0.1-2.5µg/g
Caranguejo vermelho (EUA)	Drogas bactericidas	<0.1-3.8 µg/g
Mexilhão(Canadá)	Coprostanol	322.52

Quadro 1: Concentrações de fármacos e hormônios sexuais em amostras coletadas em diferentes ecossistemas.

Fonte: Petrovic et al. (2003)

Nesse estudo foi detectada ampla cadeia de compostos de origens industrial, residencial e agrícola, como antibióticos para humanos e uso veterinário, fármacos prescritos e não prescritos e outros compostos relacionados a efluentes.

Essas ocorrências têm sido investigadas em países como Itália, Espanha, Suécia, Suíça, Países Baixos, Reino Unido, Israel, Estados Unidos, Canadá e Alemanha. Muitos autores reportaram a presença de vários produtos de cuidados pessoais no ambiente aquático. Daughton e Ternes (1999) apontaram a ocorrência de mais de 50 fármacos individuais e produtos de cuidados pessoais (PPCP's) ou metabólitos de mais de 10 classes de agentes terapêuticos em diferentes amostras, principalmente em detritos, em águas superficiais e, não menos freqüentemente, em água de abastecimento.

Nos Estados Unidos, um estudo realizado por diferentes instituições – uma delas a Agência Norte-Americana de Proteção Ambiental, USEPA – constatou a presença de fármacos em água potável de 24 das maiores áreas metropolitanas do país; alguns fármacos detectados pelo estudo estão descritos no quadro abaixo.

Local	Compostos
Arlington, Texas	1 Fármaco indeterminado
Atlanta	Acetaminofeno, cafeína
Cincinnati	Cafeína
Columbus, Ohio	Azitromicina, cafeína
Indianapolis	Cafeína
Las Vegas	Carbamazepina
Louisville	Cafeína, Carbamazepina
Minneapolis	Cafeína
New Orleans	Estrona, Naproxen
Norte New Jersey	Cafeína, Carbamazepina
Philadelphia	56, incluindo Amoxicilina, Azitromicina, Carbamazepina, diclofenaco
San Francisco	Estradiol
Tucson, Arizona	Carbamazepina

Quadro 2: Concentrações de fármacos em água potável – EUA.

Fonte: Medscape, (2008)

Os fármacos e seus metabólitos bioativos são introduzidos no ambiente em baixas concentrações. No entanto, como a entrada é contínua, resultam grandes concentrações

em longo prazo e promovem constantes e ainda pouco conhecidos efeitos adversos em organismos aquáticos e terrestres.

De todos os recursos ambientais expostos às drogas – processos industriais, disposição de produtos vencidos ou sem uso, e excreção – a excreção animal é a mais maléfica; muitas drogas de uso na medicina veterinária chegam às fezes. Quando estas fezes são dispostas na agricultura na forma de adubo, dependendo da mobilidade do solo, as drogas nelas presentes ou seus metabólitos ativos biológicos podem alcançar corpos de água e afetar organismos aquáticos e terrestres.

A mesma situação é encontrada quando lodo proveniente de ETE, contendo drogas não-biodegradáveis, tratado pelo sistema de lodo ativado é utilizado como fertilizante de solo. A incompleta remoção de muitas drogas nessas Estações representa claro risco aos humanos, (PETROVIC et al., 2003).

A persistência de uma droga no sedimento ou solo, *op.cit.*, depende principalmente: de sua foto-estabilidade, capacidade de adsorção, taxa de degradação e reação na água; a taxa de sedimentação também acelera condições de meia-vida do componente químico.

Para avaliar o risco potencial desse grupo de disruptores endócrinos, será necessário fazer ampla documentação, porque fazer análises químicas desses hormônios em ecossistemas é tarefa difícil em função da complexidade dos ecossistemas e de sua baixa concentração no ambiente.

Diversas metodologias têm sido estudadas para detecção dessas drogas no ambiente como a Cromatografia* Líquida de Alta Eficiência; a Cromatografia líquida e a Gasosa acopladas a Espectrômetro de Massas; Imunoensaios, entre outras. Nessa pesquisa foram utilizadas as metodologias de Radioimunoensaio e Quimiluminescência que, segundo o autor Breuer et al. (1975), o Radioimunoensaio (RIA) é baseado na

competição entre antígenos conjugados e não conjugados a um isótopo de iodo (I^{125}), isto é, hormônios conjugados (indicados por H^*) e hormônios não-conjugados (H), para a mesma molécula de anticorpo específico (Ac) presa em uma fase sólida =

Se os níveis de Ac e H^* forem constantes, qualquer aumento na concentração de H provoca redução de $Ac-H^*$. A quantidade de radiação emitida é inversamente proporcional à quantidade de antígeno (hormônio) presente na amostra. Por sua vez, o Imunoensaio Quimioluminescente é competitivo e baseado na competição entre antígenos conjugados e não conjugados a uma enzima (fosfatase alcalina), isto é, hormônios conjugados ($H-E$) e hormônios não-conjugados (H), para a mesma molécula de anticorpo específico (Ac) presa em uma fase sólida = $H-E + Ac + H$ ou $Ac-H-E + Ac-H$. Após a incubação do Ac fixado, amostra (H) e antígeno conjugado, à enzima ($H-E$), é adicionado um substrato quimioluminescente; a liberação de fótons é inversamente proporcional à concentração de $Ac-H$ presente na amostra (concentração do hormônio presente na amostra).

Sob a ótica do saneamento e da engenharia ambiental, há preocupações quanto à probabilidade de os hormônios chegarem ao ser humano via água, sabidamente as concentrações são baixas, mas a preocupação se deve ao fato de ser constante.

4.5. Tratamento de Água

As amostras de água coletadas para este estudo passaram por diferentes tratamentos, seja na ETA ou processos avançados em laboratório. A Estação de Tratamento de Água de São Carlos é dotada de tratamento convencional que, de acordo

com os autores Valencia (2000), Di Bernardo et al. (2002) e Campos et al. (2003) contempla os seguintes processos físico-químicos:

- ✓ **Coagulação:** Ação de mecanismos como compressão da camada difusa, adsorção e neutralização, varredura e formação de pontes. Concentrações elevadas de íons positivos e negativos na água acarretam o acréscimo do número de íons na camada difusa que, para manter-se eletricamente neutra, tem seu volume reduzido de modo que as forças de Van der Waals resultam dominantes, eliminando a estabilização eletrostática. Uma das principais funções deste processo de coagulação é a adsorção e neutralização das cargas quando as espécies adsorvíveis são capazes de desestabilizar os colóides em dosagem muito inferiores para a compressão da camada difusa; a relação entre a concentração dos colóides e a quantidade necessária de espécies desestabilizantes por adsorção segue relação estequiométrica.
- ✓ **Floculação:** Após a coagulação é necessária agitação lenta para proporcionar encontros entre as partículas menores para formação de flocos. Este processo, que pode ser realizado em unidades hidráulicas ou mecanizadas, fornece condições para facilitar o contato e a agregação de partículas previamente estabilizadas por coagulação química, visando a formação de flocos que favorecem a remoção por sedimentação, flotação ou filtração.
- ✓ **Sedimentação e Flotação:** A sedimentação é um fenômeno físico que as partículas em suspensão (flocos) apresentam movimentos descendentes em meio líquido devido à ação da gravidade, enquanto a flotação é caracterizada pela ascensão das partículas suspensas e pela aderência de microbolhas de ar. Esses processos propiciam a clarificação da água, separando a fase sólida da líquida.

- ✓ Filtração: A filtração consiste na remoção de partículas suspensas e coloidais e de microorganismos presentes na água que escoam através de um meio granular. É o processo final de remoção de impurezas.
- ✓ Desinfecção: A quantidade de espécies e de número de organismos presentes na água afeta o processo de desinfecção. A mesma concentração e tempo de contato do desinfetante são influenciados pela temperatura e pH. Os desinfetantes geralmente agem como oxidantes, o que nem sempre ocorre com os oxidantes, ter ação de desinfetante.

De acordo com Mancuso e Santos (2003), os processos avançados para tratamento e purificação de água são osmose reversa e Milli Q. A osmose reversa é uma operação em que o solvente é separado da solução mediante sua passagem por uma membrana semipermeável, não porosa, desenvolvida para reter sais e solutos com baixos pesos moleculares. A água tratada por sistema Milli Q é deionizada. A pureza da água é monitorada pela medida da condutividade. A qualidade da água deionizada pode ser detectada através da resistência em condições bem definidas. A alta resistência é obtida pela perda de íons, os quais, normalmente, funcionam como portadores (ou carreadores) de carga. Como um passo final, a água normalmente é descartada através de uma membrana filtradora de 0,22 µm.

Eu aprendi que para se crescer como
pessoa é preciso me cercar de gente mais
inteligente do que eu.

William Shakespeare

(1564-1616)

5. MATERIAL E MÉTODOS

Na primeira fase desta investigação, foi aplicada a metodologia utilizada por Govato, 1997, Kassab, 2001, Lanças, 2004 e Briguenti e Bonato, 2005:

5.1. Material e equipamento

Os hormônios Estrona, Estradiol, Estriol e Etinilestradiol foram analisados por HPLC Cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japão) modelo LC10AS, um injetor manual (seringa) com volume de injeção ajustado para 20 μ L, duas bombas LC-10 ADVP e um detector sistema *Diodo Array Detector* (DAD) modelo SPD – M10AVP; com extração em fase sólida em Octadesil silano (C_{18}) – cartucho AccuBOND C_{18} 500mg / 6mL- Agilent Technologies e Membrana de filtração Millipore 0,45-0,5 μ m

5.2. Determinações analíticas experimentais

Primeiramente foram realizados testes de aptidão do equipamento para verificar Limites de Detecção e Quantificação; verificou-se que o limite de detecção do referido equipamento era alto demais para detectar as baixas quantidades dos hormônios em estudo, encontradas em água bruta e água tratada. O protocolo para extração em cartucho C_{18} não permite filtração de grandes concentrações de amostras simples e dopadas.

O passo seguinte foi testar outros equipamentos e metodologias para detectar os estrógenos nas amostras de estudo.

Foram procurados laboratórios de análises clínicas que rotineiramente executam exames clínicos, porém em soro humano. Como no Brasil o público não está informado a respeito da presença de hormônios em água, houve certa resistência dos Laboratórios em atender nosso pedido para realizar os procedimentos solicitados.

O Centro de Diagnóstico Laboratorial (CDL), o primeiro Laboratório a realizar as análises, utilizou as metodologias de Quimiluminescência e de Radioimunoensaio. Para Estradiol e Estriol foi utilizado o equipamento analisador automatizado de imunoensaios com acesso randômico, dedicado à realização de imunoensaios e ensaios imunométricos quimiluminescentes. (Anexo A)

O referido laboratório utiliza equipamentos na forma de sistemas de análises totalmente automatizados em relação ao manuseio de amostra conjugados à incubação, lavagem e adição do substrato. A luz emitida é detectada por um tubo fotomultiplicador e os relatórios, impressos para cada amostra, são gerados por um sistema computadorizado externo.

Para a análise de Estrona, foi testado o Sistema Mini Vidas na metodologia de imunoensaios. Esse sistema, de maneira automatizada, realiza exames de Hormônios Tireoidianos (T3, T4, TSH, FT4, etc.), Hormônios de Fertilidade (LH, FSH, Progesterona, Prolactina etc.), Teste de Gravidez.

Em nenhum dos equipamentos testados foi possível realizar análise de 17α – etinilestradiol por não ser economicamente viável a aquisição de Kit deste hormônio, que somente é comercializado em grandes quantidades.

5.3. Metodologia Geral

As coletas foram feitas em duplicata, na entrada da água bruta na Estação de Tratamento de Água (Fig.2) e da água tratada foram coletadas após a cloração-fluoretação, que antecede a distribuição à população. (Anexo B)

As amostras foram coletadas em frascos de polietileno de 80mL, estéreis, fornecidos pelo Unilab e imediatamente levadas para o laboratório e centrifugadas; depois eram refrigeradas de 2 a 8°C quando não analisadas na sequência. A ETA foi escolhida como local de amostragem de água superficial. As amostras foram coletadas aos 29/05, 13/11, 23/11, 13/12 e 18/12 do ano de 2007; o período entre coleta e refrigeração ou coleta e análise não ultrapassou 1 hora.

As amostras de água com menor probabilidade de conterem contaminantes – coletadas uma após tratamento do Sistema Milli-Q e outra após Osmose Reversa – foram utilizadas como amostra controle, livre dos analitos de interesse. Acreditava-se que amostra de água que recebera os tratamentos supracitados teriam melhor qualidade, o que possibilitaria condições de trabalho mais seguras, uma vez que as etapas de otimização do método de extração necessitam longos períodos de análise.

Fig. 2: Entrada da água bruta – ETA, SAAE – São Carlos

5.4. Dinâmica do Trabalho:

Este problema, somado ao fato de no Instituto de Química o equipamento (HPLC) não ter sensibilidade suficiente e o equipamento, LC-MS ainda não estar instalado, nos levou a procurar outra solução, no caso a Cooperativa Médica de São Carlos – UNIMED São Carlos. Para este trabalho, foram programadas coletas de 10 unidades amostrais. Os Kits para detecção dos hormônios deste estudo, são comercializados em grandes quantidades para os laboratórios de análises clínicas; para pesquisa, consegue-se no mínimo de 100 kits para cada hormônio, quantidade muito superior ao programado para o trabalho, o que desperdiçaria material e verba.

A UNIMED prontificou-se em ceder o laboratório UNILAB e o de apoio, CRIESP-SP, através do Sr. Mozart Maluf Pedroso (Gerente Comercial) e Dr. Adriano Del Vale (Médico Responsável – UNILAB); concordou também em fazê-lo sem custos.

Nos laboratórios supracitados, foram empregadas as seguintes metodologias e material:

5.5. Estradiol

O Teste de Estradiol do ADVIA Centaur é um imunoensaio competitivo utilizando tecnologia quimioluminescente direta, cujo nome deriva da ligação do imunógeno de estradiol na sexta posição de especificidade aprimorada, permitindo a produção de um anticorpo altamente específico. Na amostra a ser examinada, o estradiol compete com o estradiol marcado com éster de acridina no Reagente Lite por uma quantidade limitada de anticorpo anti-estradiol de coelho, no reagente anticorpo. O anti-estradiol de coelho é

capturado por IgG anticoelho de rato, que está ligado à partículas paramagnéticas na fase sólida.

Existe uma relação inversa entre a quantidade de estradiol presente na amostra do paciente e a quantidade de unidades relativas de luz (RLUs) detectada pelo sistema.

5.5.1. Calibração da curva-mestre: o teste de Estradiol do Advia Centaur requer calibração da curva-mestre para novo lote do Reagente Lite, Fase sólida e Reagente anticorpo; é utilizado o leitor do código de barras para inserir os valores da curva-mestre.

As amostras são centrifugadas durante 10 minutos a 3.000 rpm; o recipiente de cada amostra, preparado de modo a conter aproximadamente 50µL; e eram etiquetados com código de barras;

5.5.2. Características do desempenho do equipamento: Ao diluente livre de esteróides foram adicionados compostos e obtidos os resultados abaixo. A seguir a porcentagem de alteração foi calculada como:

$$\% \text{ alteração} = \text{concentração de amostra adicionada} / \text{quantidade de composto adicionada} \times 100$$

Resultando: Estradiol: 0,005% de alteração

Estrona: 0,56% de alteração

Estriol: 0,246 de alteração

Etinilestradiol: 0,742 de alteração

5.5.3. Sensibilidade e Faixa de Teste: Este teste mede as concentrações de estradiol até 1000pg/mL com concentração mínima detectável de 7,0pg/mL.

A sensibilidade é definida como a concentração de estradiol correspondente às RLUs .

5.5.4. Padronização: O teste é validado com padrões internos desenvolvidos analiticamente e rastreáveis a cromatografia gasosa-espectroscopia de massa (GCMS). A equação descreve a relação entre os padrões de estradiol e a análise de GCMS, em toda a faixa do teste.

Estradiol Advia Centaur = $0,88(\text{GCMS}) + 9,0 \text{ pg/mL}$, $r = 0,998$

5.6. Estrona e Estriol

O teste para detecção destes hormônios é realizado através de Radioimunoensaio, com contador gama WIZARD² (PerkinElmer) ® – em sistema automático de duplo canal com marcador de Iodo – projetado para todos os tipos de amostras, com aplicação de contagem gama (Fig. 3). Para Estrona, foi utilizado o Kit DSL-8700 Active ®; e para Estriol, o Kit DSL-3700 Active ®.(Anexo C)

O Contador Wizard é ideal para amostras de atividade alta ou de baixa energia, amostras ambientais e *Shilling* testes; tem capacidade para contar amostra com volumes de até 20 mL. (Manual WIZARD², 2008)

Detector de eficiência absoluta, determinada por I^{125} utilizando método coincidente. O método não requer fonte calibrada (têm um valor conhecido padrão - DPM). Detector estabilidade probabilidade (*Chi-squared test*): que compara o desvio padrão observado com a Teoria e fornece um índice de probabilidade para comparação.

Fig. 3: Racks da WIZARD's, aceita os tubos e frascos de Radioimunoensaio.

As análises foram feitas de acordo com as Instruções de Uso-Gênese Produtos Diagnósticos, o Kit DSL-3700 ACTIVE® com os procedimentos. Estriol não Conjugado Ultra-Sensível RIA utiliza uma amostra preparada com anticorpo de coelho anti-estriol com baixa reatividade cruzada com outros estrógenos naturais e precursores de estrógenos.

5.6.1. Kit DSL-3700: Fornece material para a dosagem quantitativa de estriol não conjugado no soro. Este ensaio é destinado ao diagnóstico *in vitro* e como auxiliar no tratamento e diagnóstico de distúrbios feto-placentários.

O procedimento segue o princípio básico de radioimunoensaio no qual existe uma competição entre um antígeno radioativo e um não radioativo por um número fixo de pontos de ligação no anticorpo. A quantidade de estriol não conjugado marcado [I-125] ligado ao anticorpo é inversamente proporcional à concentração de estriol não conjugado.

Este método define a sensibilidade analítica do ensaio, que não deve ser confundido com a faixa de limite mínimo reportado para o ensaio. Com base na calibração do ensaio e nas suas características de precisão, o range reportado para o kit DSL-3700 ACTIVE® Estriol não Conjugado Ultra-sensível RIA é de 0.1 a 30 ng/mL.

5.6.2. Precisão: A precisão intra-ensaio foi determinada a partir da média de 10 réplicas com 4 amostras de soro humano.

5.6.3. Kit Estrona DSL 8700®: O procedimento segue o princípio básico de radioimunoensaio, no qual existe competição entre um antígeno radioativo e um não radioativo, por um número fixo de pontos de ligação ao anticorpo.

A quantidade de substância dosada marcada com [I-125] ligada ao anticorpo é inversamente proporcional à concentração de substância a ser dosada não marcada presente na amostra. A separação do antígeno livre e do ligado é feita utilizando-se um sistema de duplo anticorpo.

5.6.4. Sensibilidade: A sensibilidade teórica, ou limite de detecção mínimo, calculado pela média menos dois desvios padrão de 10 replicatas do Padrão Estrona 0 pg/mL é de 1,2 pg/mL.

5.7. Análise dos Dados

O tratamento estatístico foi feito com o teste de Kruskal-Wallis, tradicionalmente usado, por não exigir pressuposto. Pode ser usado para variáveis quantitativas e qualitativas ordinais. Este teste é utilizado para comparar várias amostras independentes e para testar se elas são ou não idênticas; é teste não-paramétrico que corresponde ao planejamento aleatório, quando a hipótese de normalidade é invalidada.

Suposições:

- 1- As variáveis aleatórias são mutuamente independentes;

- 2- Todas as variáveis aleatórias são contínuas;
- 3- A escala de medida é pelo menos ordinal;
- 4- Um número moderado de empates é tolerável;

Hipóteses:

H_0 : Todas as K populações são idênticas

H_1 : Pelo menos uma das populações é diferente das outras populações

Ou seja:

H_0 : As K populações tem médias iguais

H_1 : As K populações não tem todas as médias iguais

Os cálculos para este teste foram realizados através do *software* R, que é uma linguagem e ambiente para computação estatística e gráficos, desenvolvida pela *Bell Laboratories*. Este programa fornece ampla variedade de técnicas estatísticas e os dados não precisam ser distribuídos normalmente, mas as distribuições das amostras devem ser semelhantes entre si.

CORAGEM AO QUADRADO

I

Se existirem quaisquer queixas, que sejam inaudíveis

Se existir qualquer dúvida, que seja breve

Por que tanto sofrer?

Tire as amarras, limpe sua alma

Seja garimpeiro, seja herói, seja delinqüente, seja são

Lute como se fosse tua luta, a do mundo

Esqueça os lampejos da alma

Esqueça o grito e a dor

Contratempos? O que são?

II

Se existirem quaisquer mágoas, que sejam intermitentes

Se existir qualquer lapso, que seja único

Por que tanto sofrer?

Prepare-se e vá, não aja de outra forma!

Seja, antes de mais nada, coração

Faça da tua espada, a espada do mundo

Esqueça as farpas no caminho

Esqueça quem não o consolou

Contratempos? O que são?

Jorge L. R. Pantoja Filho

Doutorando SHS - 2008

(Homenagem a este amigo...)

6 . A CIDADE DE SÃO CARLOS

São Carlos, um município brasileiro situado próximo do centro geográfico do Estado de São Paulo, fica a uma distância rodoviária de 231 quilômetros da capital paulista. Com população de 218.702 habitantes (projeção do IBGE, 2006), distribuídos em uma área total de 1.141 km², é a 14ª maior cidade do interior do Estado em número de residentes.

Clima ameno, com temperatura média anual de 19,6 °C, o qual somado às altitudes médias entre 800 e 1.000 metros, faz de São Carlos um local muito agradável, com inúmeras cachoeiras, curiosas formações geológicas e belíssimas paisagens. (<http://www.saocarlos.sp.gov.br/>)

6.1. A Estação de Tratamento de Água de São Carlos

O SAAE atende a 100% da cidade de São Carlos com água tratada da Estação de Tratamento de Água (E.T.A.), Estação de Tratamento de Água do CEAT e por meio do tratamento direto nos Poços Profundos com cloro e flúor.

Quando da sua fundação em 1959, a ETA captava água do Córrego do Feijão e do Córrego Espreado; inicialmente o volume captado era de 210 litros/s e em 1971 passou para 540 litros/s.

A população de São Carlos consome pouco mais de 2.300.000 m³/mês de água tratada; a E.T.A. (Fig.4) é responsável pelo tratamento de aproximadamente 50% da produção superficial; o restante provém dos poços profundos – produção subterrânea – localizados em pontos estratégicos da cidade, nos quais depois de a água ser tratada com a adição de cloro e flúor é distribuída para a população. (Fonte: SAAE – São Carlos)

Fig.4: Esquema do funcionamento da E.T.A., SAAE – São Carlos

7. RESULTADOS

7.1. Resultados preliminares determinados no primeiro pré-teste realizado no Laboratório CDL:

Tabela 2: Resultados CDL

<i>HORMÔNIO EM ESTUDO</i>	<i>VALOR ENCONTRADO</i>
17 β –estradiol	24.3 pg/mL
Estriol	0.30 ng/mL
Estrona	5 pg/mL
17 α – etinilestradiol	Não disponível

7.2. Resultados determinados no pré-teste, realizado no laboratório UNILAB e no Apoio Criesp:

Tabela 3: Teste 1 = Água Tratada (13/11)

<i>HORMÔNIO EM ESTUDO</i>	<i>VALOR ENCONTRADO</i>
Estrona	1,5 pg/mL
Estradiol	<7.00 pg/mL
Estriol	Indetectável

EE2 = Reações cruzadas de Estradiol com Etinilestradiol são muito baixas (0,023 a 0,1%) – Especificidade dos equipamentos.

7.3. Resultados

7.3.1. Qualidade da Água – Data de Coletas

Tabela 4: Análise Bacteriológica (Fonte: SAAE – São Carlos)

		<i>Coliformes Totais (UFC/ml)</i>	<i>Termotolerantes (fecais) (UFC/ml)</i>
29/05/2007	Córrego Espraiado	420	370
	Córrego Feijão	610	140
23/11/2007	Córrego Espraiado	650	250
	Córrego Feijão	620	280
13/12/2007	Córrego Espraiado	680	34
	Córrego Feijão	710	80
17/12/2007	Córrego Espraiado	800	20
	Córrego Feijão	700	90

UFC: Unidade formadora de colônia

Tabela 5: Análise Físico-Química (Fonte: SAAE – São Carlos, 2007)

<i>Data</i>	<i>Hora</i>	<i>Chuvas</i>	<i>Cloro</i>	<i>Local de coleta</i>	<i>Origem</i>	<i>Temp °C</i>	<i>Turb NTU</i>	<i>Cor</i>	<i>pH</i>	<i>Flúor</i>
29/05	09:00	Fracas	1,25	ETA	S.S	21	0,17	0	6,96	0,61
13/11	09:00	Aus		ETA	S.S	22	1,27	3	7,05	0,63
23/11	08:55	Aus	1,3	ETA	S.S	22	0,36	0	6,62	0,49
13/12		Média		ETA	S.S	22	0,28	0	7,96	0,77
18/12	09:00	Aus	1	ETA	S.S	22	0,26	0	6,54	0,68
29/05	08:50	Fracas		Fei.	Cap.	18	9,41	99	6,1	
29/05	08:45	Fracas		Esp.	Cap.	18	5,58	65	6,2	
13/11	08:30	Aus		Esp.	Cap.		9,71	179	6,42	
23/11	08:45	Aus		Esp.	Cap.	21	8,62	130	6,22	
13/11	08:40	Aus		Fei.	Cap.		15,8	227	6,21	
23/11	08:45	Aus		Fei.	Cap.	21	9,66	149	6,29	
13/12		Média		Fei.	Cap.		21,6	217	6,08	
17/12		Aus		Fei.	Cap.		6,32	104	5,83	
13/12		Média		Esp.	Cap.		12	131	6,19	
17/12		Aus		Esp.	Cap.		6,2	91	5,92	

Turb: Turbidez

Aus: Ausente

Cap: Captação

Esp.: Córrego Espraiado

ETA: Estação de Tratamento de Água

Fei.: Córrego Feijão

S.S: Saída de Sistema

Temp: Temperatura

Observa-se um valor elevado de coliformes fecais nos dias 29/05 e 23/11. O córrego do Feijão apresentou maior cor e turbidez no dia 13/12. Esses resultados podem indicar contaminação por efluentes domésticos.

7.3.2. Resultados determinados no laboratório UNILAB e no Apoio CRIESP (Laudos, Anexo D):

Tabela 6: Resultados Estrona – pg/mL (E1)

<i>Água Bruta</i>	<i>Tratamento Água SAAE</i>	<i>Tratamento Osmose Reversa</i>	<i>Tratamento Milli Q</i>
1,5	1,5	1,5	1,5
1,5	1,5	1,5	1,5
1,5	1,5		
1,5	1,5		

Tabela 7: Resultados Estradiol – pg/mL (E2)

<i>Água Bruta</i>	<i>Tratamento Água SAAE</i>	<i>Tratamento Osmose Reversa</i>	<i>Tratamento Milli Q</i>
< 7	< 7	< 7	< 7
< 7	< 7	< 7	
	< 7		

Tabela 8: Resultados Estriol – ng/mL (E3)

<i>Água Bruta</i>	<i>Tratamento Água SAAE</i>	<i>Tratamento Osmose Reversa</i>	<i>Tratamento Milli Q</i>
0,10	0	0,1	0
0	0	0	0
0	0	0,5	
	0,1		

Considerações:

Os índices que possuíam “ - ” foram considerados como não existente;

Os índices com resposta “indetectável” foram considerados como 0;

As amostras da sessão 4 – amostra dopada – não foi considerada por ter sido aplicada para verificar a sensibilidade dos equipamentos e metodologia.

Pode-se observar de acordo com as tabelas 4, 5 e 6, que a ETA ainda não é o “processo” mais eficiente para a remoção dos analitos de interesse, uma vez que em água tratada foram encontrados valores de hormônios semelhantes aos da água bruta.

Tabela 9: Resultados amostras dopadas (E1 pg/mL, E2 pg/mL, E3 ng/mL)

<i>Amostra</i>	<i>E1(Estrona)</i>	<i>E2(Estradiol)</i>	<i>E3(Estriol)</i>
X	5793	>1000	1113,40
Y	5450	>1000	1251

Amostras - informações

Amostras 1 A e 1B: Água Purificada(Osmose Reversa – LATAR)

Amostras 2 A e 2B: Água Tratada - SAAE

Amostras 3 A e 3B:Água Bruta - SAAE

Amostras 4 A e 4B: Água Dopada(Hormônios E1(Estrona); E2(Estradiol); E3(Estriol) e EE2(Etinilestradiol))

Amostras 5A e 5B: Água Milli Q

Gráfico 1: Estrona

Pico referente à variável 4, amostra dopada. Variáveis 2 e 3 possuem maior número de amostras, portanto colunas maiores; médias de 1,5 pg/mL.

Gráfico 2: Estradiol

Resultados iguais em função da sensibilidade do equipamento. A variável 4 representa a amostra dopada, a variável 5, por possuir apenas 1 amostra, apresenta barra menor; as variáveis 1 e 3 possuem o mesmo número de amostras e a variável 2 possui 3 amostras com uma média de 7pg/mL ($< 7,00$).

Gráfico 3: Estriol

O estriol apresenta picos nas variáveis 1, 2 e 5 e na variável 4, amostra dopada.

Este histograma possui barras menores, provavelmente pelo fato de em muitas amostras o analito ser indetectável, no entanto, deve-se ressaltar que este analito foi encontrado em concentrações de nanogramas por mililitros.

7.4. Teste de Kruskal – Wallis, via *software R*.

Teste 1:

O teste 1 para estrona, com nível de significância de 5%, rejeita a hipótese nula do p-valor, ou seja, a média de estrona não é igual em todas as populações, o que mostra interferências dos processos de tratamento.

Teste 2:

O teste 2, para estradiol, com nível de significância de 5%, observa o p-valor; não foi rejeitada a hipótese nula, ou seja, a média de estradiol é igual em todas as populações. Refere-se à sensibilidade do equipamento.

Teste 3:

No teste 3 para estriol, para o qual foi adotado um nível de significância de 5%, observa-se o p-valor e foi rejeitada a hipótese nula, ou seja, a média de estriol não é igual em todas as populações; o que mostra diferenças entre os processos de tratamento, mesmo que muitas amostras não possuam os analitos de interesse, isto é, seja, indetectável.

“Veneno ou remédio?
Questão de dose”.

Claude Bernard
(1813 -1878)

8. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

A proposta do trabalho foi cumprida e a hipótese testada foi confirmada. No equipamento HPLC não foi possível realizar as análises do estudo em função de sensibilidade, mas por Radioimunoensaio e Quimiluminescência, os objetivos foram cumpridos.

Os Padrões Brasileiros não estabelecem limites de referência para os analitos que foram estudados nesta pesquisa; por este motivo, ainda não é possível serem estabelecidas comparações sobre periculosidade, toxicidade, potabilidade etc.

Embora as quantidades detectadas dos estrógenos investigados sejam muito baixas, quer em água bruta, quer na água tratada, a literatura científica informa que, em ambas, esses estrógenos têm potencial para alterar não só as condições do meio aquático, como também a qualidade de reprodução humana, o que constitui problemas de saúde ambiental e de saúde coletiva.

A preocupação consiste não apenas no fato de muitos estrogênios e anti-androgênios contaminarem o ambiente; a questão mais relevante é saber se esses dois fatores estão relacionados e para isso serão necessárias investigações ao longo de muitos anos, com muitas informações para ser possível haver uma resposta inequívoca.

Seria interessante que fossem feitos estudos mais aprofundados no que diz respeito à coletas de amostras em pontos distintos nos rios, próximos a despejos de efluentes. Também é muito importante verificar a sensibilidade para detecção em outros equipamentos.

Uma sugestão para futuros trabalhos é comparar os resultados em ETAs, para verificar se diferentes processos de tratamento de água removem diferentes quantidades

dos estrógenos estudados nesta pesquisa. Outro possível trabalho é, em escala de laboratório, verificar se processos com diferentes coagulantes químicos; carvões ativados; flotação; associações como floto-filtração; desinfetantes e outros são mais eficientes em removerem quantidades diferentes dos estrógenos estudados nesta pesquisa.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Resolução n. 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. [http://: www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acesso em 18/01/2007

ARAI Y, et al. (1983) **Long-term effects of perinatal exposure to sex steroids and diethylstilbestrol on the reproductive system of male mammals.** *International Review of Cytology* 84: 235-268.

AUGER J.; et al. (1995) **Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years.** *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 51 87-97

BARCELÓ, D. M. et al (2003) **Liquid chromatography – (tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment.** *Journal of Chromatography A*, v.1000, p.503-526.

BERQUÓ, E. S. (1981) **Bioestatística.** 1 ed. São Paulo: EPU

BREUER, H. et al. (1976). **Methods of hormone analysis.** Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

BRIGUENTI, A.C.C., BONATO, P.S.(2005). **Análise simultânea de mirtazapina e N-desmetilmirtazapina em plasma empregando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.* Vol.41, out/dez.

CAMPOS, J.R. et al. (2003). **Conceitos Gerais sobre Técnicas de Tratamento de Águas de Abastecimento, Esgotos Sanitários e Desinfecção.** São Carlos, SP. SHS/EESC/USP

CASTRO, C. M. B. (2002) **Perturbadores endócrinos ambientais: uma questão a ser discutida.** *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, v.7, n.1, p.4-5.

COLBORN, T. et al. (1997). ***Our Stolen Future: Are We Threatening Our Fertility, Intelligence and Survival?*** N.Y. Penguin Books.

DANISH Enviromental Protection Agency(2001) Working Report n. 44

DAUGHTON, C.G.,TERNES, T.A.(1999) *Enviromental Health Perspectives*. 107: 907

DAVIS, D. L., BRADLOW, H. L. **Can Environmental Estrogens Cause Breast Cancer?** Scientific American. October 1995, p.166.

DI BERNARDO, L. et al. (2002). **Ensaio de Tratabilidade de Água e dos Resíduos gerados em Estação de Tratamento de Água**. São Carlos, SP: RIMA.

EUR 17549 (1996) European workshop on the impact of endocrine disrupters on human Health and Wildlife. Report of Proceedings. Weybridge: UK: Environment and Climate Research Programme of DG XII of the European Commission.

GOVATO, E.B. **Determinação de hormônios esteróides em preparações farmacêuticas por cromatografia líquida de alta eficiência**. São Paulo, 1997. 113p.Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.

HEISTERKAMP, I. et al (2003). **Bioassay-directed chemical analysis utilizing LC-MS: a tool for identifying estrogenic compounds in water samples**. *Analytical Bioanalytical Chemistry*(2004) 378:709-715.

HUANG, Y. et al (2003). **Ocurrence and effects of Endocrine Disrupting Chemicals in the Environment**. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Wast Management*. October 2003. 241-252

Instruções de Uso - Gênese Produtos Diagnósticos. Estriol. Revisão-Assessoria: 30/01/2004. Disponível em [http:// www.gendiag.com.br](http://www.gendiag.com.br). Acesso em 06/02/2008.

Instruções de Uso - Gênese Produtos Diagnósticos. Estrona. Revisão-Assessoria: 20/09/2005. Disponível em [http:// www.gendiag.com.br](http://www.gendiag.com.br). Acesso em 06/02/2008.

KASSAB, N.M. **Determinação de hormônios esteróides em contraceptivos orais por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.** São Paulo, 2001. Dissertação(mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

KACLOCK, R.J. et al (1996). **“Research needs for risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the U.S. EPA-sponsored workshp.** *Enviromental Health Perspectives*, 104, 717-740.

LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos de análise** – São Carlos: RiMa, 2004. 62p.

LARSEN, P. R. et al. (2003). **Williams Textbook of endocrinology.** 10^a ed. Philadelphia: Elsevier Science.

LÓPEZ de ALDA, M., Barceló, D.(2001) *Journal of Chromatography A*.911: 203-210

WIZARD Manual. PerkinElmer, Inc. Waltham: EUA, 2008. Disponível em: <http://www.perkinelmer.com/easoffices>. **Acesso em 06/02/2008.**

MANCUSO, P.C.S.; SANTOS, H.F.(2003).**Reuso de Água.** Barueri,SP: Manole.

NAGEL S, et al. (1997) **Relative binding affinity-serum modified access (RBASMA)assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A andoctylphenol.** *Environmental Health Perspectives* 105: 70-76.

NOPPE, H. et al (2004) **Development and validation of an anlytical method for detection of estrogens in water.** *Analytical Bioanalytical Chemistry*. 382: 91-98.

PEREIRA, A. et al (2005). **Desafios da química analítica frente as necessidades da indústria farmacêutica.** *Química Nova*, Vol. 28, Suplemento, S107-S111.

PETROVIC, M. et al(2003). **Endocrine Disrupting Compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurrence data.** *Analytical Bioanalytical Chemistry*(2004) 378: 549-562.

PREZIOSI, P.(1998) **Endocrine disrupters as environmental signallers: an introduction.** *International Union of Pure and Applied Chemistry*, v.70, p.1617 –1631.

REIS FILHO, R.W. et al (2005) **Hormônios sexuais Estrógenos: Contaminantes Bioativos.** *Química Nova*, vol 29, n.4, 817-822.2006

SÃO CARLOS - SP. <http://www.saocarlos.sp.gov.br/> Acesso em 23/03/2007.

SERVIÇO AUTÔNOMO DE ÁGUA E ESGOTO – SAAE/SÃO CARLOS.
<http://www.saaesaocarlos.com.br/>. Acesso em 23/03/2007; 03/03/2008.

SKAKKEBAEK N.E, TOPPARI, J. et al. (1998) **Germ cell cancer and disorders of spermatogenesis: an environmental connection?** *APMIS* 106: 3-12.

SNYDER, S.A. et al (2001) *Environment Science Technology*. 35: 620-3625.

SHARPE, R.M.(1998) *Pure Applied Chemistry*, 70: 1685-1701 b

TILTON, F. et al (2002) *Aquatic Toxicology*. 61: 211-224

TOPPARI, J. et al. (1996) **Male reproductive health and environmental xenoestrogens.** *Environmental Health Perspectives* 104 (supplement 4): 741-803

TOPPARI, J. et al. (1998) **Sexual differentiation and environmental endocrine disrupters.** *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism – Vol.12, nº 1, Abril.*

VALENCIA, J.A.(2000). **Teoria y Practica de La Purificación del Agua.** Santa Fé de Bogotá, Colômbia: Mc Graw Hill. 3ª Ed.

ZINK, C.(1988). **Diccionario Pschyrembel de Ginecologia y Obstetricia.** Berlin, New York: Walter de Gruyter Verlag.

WebMD Health Professional Network. <http://www.medscape.com/home>. Acesso em 11/03/2008.

ANEXO A
EQUIPAMENTOS E PADRONIZAÇÃO

EQUIPAMENTOS

Immolute - DPC Medlab (USA)

Sistema Mini Vidas

A automatização do equipamento, que dispensa o manuseio de amostras e reagentes, evita erros de pipetagem e trocas de reagentes; propicia técnicas com resultados muito mais acurados do ponto de vista do coeficiente de variação intra-ensaios, além de diminuir o risco de acidentes com materiais biológicos ou reagentes e de oferecer maior proteção ao operador.

Immolute

Fonte: Centro de Diagnóstico Laboratorial

Sistema Mini Vidas

Fonte: Centro de Diagnóstico Laboratorial

ANEXO B
PONTOS DE COLETA

ANEXO C
PROCEDIMIENTO
ESTRONA E ESTRIOLO

ESTRONA E ESTRIOLO

Normalização Automática: Todas as correções – tais como efeitos, *background*, e eficiência – são calculadas e realizadas automaticamente por um normalizador definido para cada isótopo. Os resultados são automaticamente corrigidos para decaimento, seja para qualquer data ou para início do ensaio.

Traçador – perfil – precisão e RER (resposta-erro-relacionamento): Curvas de ensaio indicam precisão (CV% da Concentração versus concentração), em diferentes áreas de concentração. Regras de controle da qualidade podem ser usadas para automaticamente detectar situações fora de controle.

Kit DSL-3700 ACTIVE®

Padronização: Um frasco, 0.5 mL, identificado pela letra A, contendo 0 ng/mL de estriol, e seis frascos, 0.5 mL cada, identificados de B-G, contendo concentrações de aproximadamente 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0 e 30 ng/mL (0.35 - 105 nmol/L) de estriol não conjugado em soro humano com um conservante livre de mercúrio.

Materiais Fornecidos para ensaio: Materiais fornecidos no kit DSL ACTIVE® Estriol não Conjugado Ultra-Sensível; Estriol não Conjugado Padrão A; Estriol não Conjugado Padrão B; Estriol não Conjugado Padrão C; Estriol não Conjugado Padrão D; Estriol não Conjugado Padrão E; Estriol não Conjugado Padrão F; Estriol não Conjugado Padrão G; Tubos Revestidos – Anticorpo; Estriol não Conjugado; Reagente Estriol não Conjugado [I-125]; Estriol não Conjugado Controle Nível I e Estriol não Conjugado Controle Nível II.

Materiais Necessários não fornecidos pelo Kit: Tubos de teste 12 x 75 mm; Estante para tubos 12x75 mm; Água deionizada; Pipeta de precisão para dispensar 50µL; Pipeta de repetição para dispensar 500µL; Agitador vórtex; Estante de esponja ou similar para a decantação; Material absorvente para drenagem dos tubos; Contador Gama e Programa de análise de dados para RIA.

Controle de qualidade: Os Controles DSL ou outros controles comerciais devem estar dentro dos limites de confiança estabelecidos. Os limites de confiança para os Controles DSL estão impressos nos rótulos dos frascos. Controles níveis alto e baixo devem ser incluídos a cada ensaio.

Sensibilidade: A sensibilidade teórica, ou limite mínimo de detecção é calculado pela interpolação das médias menos dois desvios padrões de 6 replicas do padrão 0 ng/mL de Estriol não Conjugado é 0.03 ng/mL.

Especificidade: A reatividade cruzada do anticorpo estriol não conjugado foi medida contra vários componentes com o kit DSL-3700 ACTIVE® Estriol não Conjugado Ultra Sensível RIA. A porcentagem de reatividade cruzada é expressa na proporção da concentração de estriol não conjugado, com a concentração dos componentes reagidos a 50% de ligação com o padrão 0 ng/mL de Estriol não Conjugado.

Método de comparação: O kit DSL-3700 ACTIVE® Estriol Ultra Sensível não Conjugado Tubos Revestidos RIA foram comparados com outro kit disponível comercialmente de estriol não conjugado (Método X). Amostras de soro de 126

indivíduos foram ensaiadas e uma análise de regressão linear dos resultados vem a seguir:

Amostra range: 0.51 - 10.92 ng/mL

DSL-3700 = 0.58 [Método X] - 0.03

$r = 0.97$

KIT ESTRONA DSL 8700®

Padrões Estrona: Um frasco de 1 mL, identificado como A, contendo 0 pg/mL; e seis frascos de 0,5 mL cada, identificados de B a G, com concentrações de, aproximadamente, 15, 35, 100, 300, 900 e 2000 pg/mL (56 - 7400 pmol/L) de estrona em soro (isento de estrona) com azida sódica como conservante.

Nota de padronização: Devido à ausência de material de referência aceitável universalmente, a preparação de referência dos Controles e Padrões Estrona foi obtida a partir da Sigma Biochemicals, USA, purificada por HPLC, pureza verificada por cromatografia de camada delgada e desempenho verificado por imunoensaios.

Materiais para ensaio incluído no kit RIA Estrona DSL: Padrão Estrona A; Padrão Estrona B; Padrão Estrona C; Padrão Estrona D; Padrão Estrona E; Padrão Estrona F; Padrão Estrona G; Anti-soro Estrona; Reagente Estrona [I-125]; Reagente de Precipitação; Controle Estrona Nível I e Controle Estrona Nível II.

Material necessário não incluído no kit DSL: Tubos de ensaio de vidro de 12 x 75mm; estante para tubos de ensaio 12 x 75 mm; pipeta de precisão para dispensar 50 µL;

pipeta de repetição para dispensar 100 µL e 1 mL; agitador de vórtex; centrífuga (1500 xg, preferencialmente refrigerada); material absorvente para drenagem dos tubos; contador gama e programa de análise de dados de RIA.

Limitações: Os reagentes incluídos neste kit foram otimizados para determinação de níveis de estrona em soro. Outros tipos de amostras poderão apresentar, em média, leitura 5 –10% menor.

Precisão: A precisão intra-ensaios foi determinada a partir da média de 10 replicas para cada amostra. A precisão inter-ensaio foi determinada a partir da média da média de duplicatas de 8 corridas separadas.

Especificidade: A reatividade cruzada do anti-soro para estrona foi determinada contra vários compostos. A porcentagem de reatividade cruzada é expressa como a relação entre a concentração de estrona e a concentração do composto reativo a 50% de ligação com o Padrão Estrona 0 pg/mL.

Comparação de Métodos: O Kit RIA Estrona DSL-8700 foi comparado a um outro RIA para Estrona comercialmente disponível (x) através da análise de 50 amostras de soro dentro de uma faixa de 4 – 905 pg/mL. Os resultados foram os seguintes:

Regressão: $[\text{DSL-8700}] = 1,69 [x] + 2,5$

$r^2 = 0,95$, $p < 1,0 \times 10^{-7}$

ANEXO D

LAUDOS UNILAB E CRIESP

GLOSSÁRIO

Andrógenos: denominação genérica para os hormônios sexuais masculinos (hormônios esteróides C19). Biosíntese: os andrógenos são produzidos, entre outros lugares, nas células intersticiais de Leydig do testículo. Pequenas quantidades de andrógenos são sintetizadas no ovário e na glândula supra-renal. **Metabolismo:** a degradação acontece 80% no fígado e o restante na pele e na próstata. A eliminação é renal e em forma de androsterona e etiolanolona. O tempo de vida média fisiológica é de aproximadamente, 12 minutos. O andrógeno mais importante é a testosterona (a mais concentrada em soro humano) seguido de seus metabólitos androstendiona e androsterona. **Efeitos:** hipogonadismo, puberdade tardia; oligozoospermia. **Contra-indicação:** Gravidez, tumores prostáticos.

Ciproterona, Acetato de Ciproterona: a ciproterona é um derivado da 17 α -hidroxiproterona, com intenso efeito antiandrogênico e gestagênico, que inibe a secreção de gonadotropinas e ocasiona uma inibição competitiva dos receptores androgênicos. Emprego terapêutico: câncer de próstata e puberdade precoce.

Clomífeno: clomifenum, dietil-(2-(p-(β -cloro- α -fenil-estiril)-fenoxi)-etil) amina (IUPAC); CAS-Nº 91145-5; PM 405,98; derivado sintético do estilbeno, com ação levemente antiestrogênica. **Mecanismo de ação:** inibição competitiva dos receptores de estrógenos no hipotálamo e na hipófise, o que conduz à uma ovulação por efeito da maior liberação incrementada de gonadotropinas. **Emprego terapêutico:** para indução da ovulação em ciclos anovulatórios; estimula a espermogênese, em caso de oligospermia masculina.

Coliformes, Termotolerantes e Totais: Coliformes Totais, que são grupos de bactérias gram-negativas, que podem ser Aeróbias ou Anaeróbias, que não formam esporos, e são associadas à decomposição de matéria orgânica em geral. Há também os **Coliformes Fecais**, também chamados de **Coliformes Termotolerantes** pois suportam temperaturas acima de 40°C, nas quais se reproduzem- em menos de 24 horas. Este grupo é associado às fezes de animais de termotolerantes , de onde ter sido muito usual

o nome coliformes fecais.. Pelo estudo da concentração dos coliformes nas águas foi estabelecido um parâmetro indicador da existência de possíveis microorganismos patogênicos que são responsáveis pela transmissão de doenças pelo uso ou ingestão da água, tais como a febre tifóide, febre paratífóide, disenteria bacilar e cólera.

Contracepção hormonal: : forma de contracepção que teve início em 1960 – baseada na ingestão regular ou na administração parenteral – segundo um esquema determinado de preparados que contêm estrógenos e gestágenos ou apenas gestágenos. O modo de ação dos hormônios esteróides empregados não está baseado apenas na inibição da ovulação por supressão das gonadotropinas, mas também, segundo o tipo de hormônio e sua dosagem, em modificações do muco cervical (mediante o qual é dificultada ou impossibilitada a migração dos espermatozóides), em modificações do endométrio. Quando da interrupção da administração hormonal, após 21 dias, aparecem hemorragias cíclicas, similares às da menstruação.

Os anticoncepcionais ou contraceptivos orais combinados até o momento, apresentam a maior segurança alcançada contra uma concepção não desejada. Como regra geral, a favor da segurança, devem ser aplicados contraceptivos orais combinados de baixas dosagens.

Criptorquidia: Nos últimos meses de vida intra-uterina, os testículos formados no interior do abdômen migram para o escroto, seguindo uma rota que passa pelo canal inguinal. Se essa migração ficar comprometida por hérnias ou por anomalias na conformação do abdômen inferior, os testículos não alcançam a bolsa escrotal naturalmente.

Cromatografia: (do grego *χρώμα:chroma*, cor + *γραφειν:"grafein"*, grafia), é uma técnica que envolve uma série de processos de separação de misturas. E o nome dado a processo através do qual moléculas presentes em misturas complexas podem ser separadas com base nas suas solubilidades em diferentes solventes e em suas mobilidades em diferentes substratos. A cromatografia acontece pela passagem de uma mistura através de duas fases: uma estacionária (fixa) e outra móvel. A grande variabilidade de combinações entre a fase móvel e estacionária faz com que a cromatografia tenha uma série de técnicas diferenciadas.

Desfeminização: forma da androgenização(masculinização) da mulher: atrofia uterina e mamária, amenorréia e esterilidade, ciclos anovulatórios, diminuição do folículo adiposo típico da mulher.

Desogestrel (INN): desogestrel (INN-E), 13-etil-11-metilén-18,19-dinor-17 α -pregno-4-em-20-in-17-ol (IUPAC); CAS-Nº 54024-22-5; C₂₂H₃₀O. PM 310,48; progestógeno sintético com elevada especificidade gestagênica não mostra efeitos androgênicos parciais no estrogênico quando é empregado em doses terapêuticas. O desogestrel é metabolizado no fígado a 3-ceto-desogestrel, biologicamente ativo.

Dietilestilbestrol: 4,4'-(1,2-dietil-1,2-etenedil) bisfenos; C₁₈H₂₀O₂; PM 268,34; derivado sintético estilbênico, com efeito, estrogênico correspondente ao estradiol. Se atravessar a placenta., tem efeito carcinogênico e tóxico para o embrião. São observados adenocarcinomas na vagina e no colo uterino e nas filhas descendentes das mães que receberam dietilestilbestrol durante a gravidez (síndrome de estilbestrol), e anomalias gonadais na descendência masculina.

Efeitos Colaterais: entre outros efeitos, os estrógenos – especialmente em doses elevadas – favorecem a aparição de complicações tromboembólicas (a literatura descreve um incremento da incidência de infarto de miocárdio e transtornos vasculares cerebrais). Se forem usados por períodos prolongados. Substâncias manipuladas contendo estrógenos/gestágenos poderá haver elevação da pressão sangüínea:seguida de aumento de peso, retenção de líquidos com tendências a edemas e sintomas gerais como náuseas, vômitos, dores de cabeça e nos seios, alterações menstruais, transtornos psíquicos etc.

Endócrino, sistema: É formado pelo conjunto de glândulas que apresentam como atividade característica a produção de secreções denominadas hormônios. As glândulas que constituem o sistema endócrino são : hipófise, hipotálamo, tiróide, supra-renais, pâncreas gônadas (ovários e os testículos).

Esteróides sexuais (hormônios sexuais): hormônios que servem às funções sexuais, são responsáveis pelo desenvolvimento das características sexuais masculinas e femininas. **Hormônios sexuais femininos** (hormônios esteróides): estrógenos e progesterona (gestágenos); são produzidos nos ovários, na placenta e em escassa

quantidade, na glândula supra-renal, assim como na unidade feto placentária. **Hormônios sexuais masculinos** (hormônios esteróides): andrógenos, especialmente a testosterona; são produzidos nos testículos e também, em pequena quantidade, no ovário feminino e glândulas supra-renais. Os hormônios sexuais estão submetidos ao autocontrole mediante o sistema hipotálamo-hipofise.

Estilbenos: derivados do α -, β -difeniletileno; estrógenos sintéticos não esteróides; em sua maioria, os efeitos biológicos são coincidentes com os dos estrógenos naturais. O estilbeno mais conhecido é o dietilestilbestrol, hoje de aplicação obsoleta, devido aos seus efeitos cancerígenos.

Estradiol (INN): estradiolum (INN-L), estradiol (INN-E), 1,3,5 (10)-estratrién-3,17 β -diol (IUPAC); CAS-Nº 50-28-2; C₁₈H₂₄O₂; PM 272,37; o mais potente estrógeno natural.

Estriol: 1,3,5(10)-estratrién-3,16 α ,17 β -triol; PM 288,37 produto metabólico e de excreção do estradiol e da estrona, com fraco efeito estrogênico; é produzido principalmente na placenta.

Estrógenos: hormônios esteróides com 18 átomos de carbono e um anel aromático insaturado. São produzidos nos ovários e, durante a gravidez também na placenta. Em quantidade escassa, é também produzido pelas glândulas supra-renais e nos testículos. Tempo de vida média dos estrógenos naturais: 60-90 minutos. Os estrógenos fisiologicamente mais importantes são **estradiol**, **estrona** e **estriol**. A atividade biológica diminui gradativamente e a sequência é indicada com um fator de três. Os estrógenos são predominantemente excretados por via renal São administrados por via oral os **estrógenos sintéticos** etinilestradiol e o 3-metiléter de etinilestradiol (mestranol). Todos os processos reprodutores femininos são controlados por estrógenos e gestágenos; via de regra, os mais ativos são os estrógenos. Empregados para a maturação folicular, desencadeamento da liberação ovulatória de LH, e transporte do óvulo, proliferação de endométrio na primeira metade do ciclo, composição das secreções do útero e do cérvix e estrutura do epitélio vaginal. **Emprego clínico:** entre outros, como componentes dos contraceptivos orais para a contracepção hormonal na terapia das doenças climatéricas.

Sinopse dos efeitos fisiológicos:

Função, órgão	Efeito
Sistema nervoso central	Efeito sobre o hipotálamo e a hipófise: incremento da secreção de LH/FSH, inibição de hormônio liberador de gonadotropinas.
Vagina	Multiplicação de células superficiais, depósito de glucógeno.
Cérvix	Dilatação do orifício e canal cervical
Endométrio	Proliferação.
Miométrio	Incremento da contractilidade e da resposta à oxitoxina.
Trompas	Incremento da mobilidade e da secreção.
Ovários	Sensibilidade frente às gonadotropinas.
Mamas	Estímulo de crescimento.
Metabolismo	Geral: incremento da irrigação sangüínea e da permeabilidade celular, retenção de sódio e água, crescimento intensificado, estimulação da síntese protéica, diminuição da temperatura corporal. Hidratos de carbono: escasso efeito (o efeito depende da administração concomitante de gestágenos) Lipídios: aumento de triglicerídeos (incremento do metabolismo das VLDL), colesterol, lipoproteínas de alta e baixa densidade.
Coagulação sanguínea	Aumento dos fatores I e VIII

Estrona (INN): estronum (INN-L), estrona (INN-E), 3-hidroxi-1,3,5 (10-estradien-17-ona (IUPAC); CAS-Nº 53-17-6; $C_{18}H_{22}O_2$; PM 270,36; junto com o estradiol, estrógeno formado primariamente no organismo animal. A estrona e o estradiol transformam-se reciprocamente, eu uma outra, com facilidade, mas o efeito do estradiol é mais potente.

Valores séricos normais (pg/ml; método de referência: espectrometria de massas)

Grávidas:	
1º trimestre	350 – 2740
2º trimestre	1820 – 7100
3º trimestre	2100 – 12800
Mulheres não Grávidas:	
Fase de maturação folicular	30 – 120
Fase luteica	100 – 275
Menopausa	20 – 50
Homens:	20 – 55

Exógeno: Que provém do exterior, que se produz no exterior (do organismo, do sistema), ou que é devido a causas externas.

FSH: abreviatura (inglês) de, *follicle stimulating hormone*, sinonímia: Folitropia; glucoproteína produzida no lóbulo anterior da hipófise, com um PM de 34.000, pertencente às gonadotropinas; a estrutura química ainda não foi estabelecida e seu componente principal são os ácidos sálicos. A liberação, desde o lóbulo anterior hipofisário, é regulada pela FSH *releasing hormone* (provavelmente idêntica a LH-RH).

Hipospadia: É uma máformação congênita do meato urinário, no sexo masculino. É caracterizada pela abertura em posição anormal, na face ventral do pênis ou mais raramente na bolsa escrotal. Geralmente o prepúcio passa a ter formato de capuz. Há algumas evidências de que, nas últimas décadas, a incidência de hipospádias têm crescido no mundo todo. Nos Estados Unidos, dois estudos relataram acréscimo da incidência cresceu em cerca de 1 em 500 nascimentos (1 em cada 250 meninos) na década de 1970, para 1 em 250 nascimentos (1 em 125 meninos) na década de 1990.

Homeostase: O termo homeostasia foi criado pelo fisiologista Walter Cannon (1871-1945) para definir o processo de regulação pelo qual um organismo mantém constante o seu equilíbrio térmico. Em fisiologia diz-se do estado de equilíbrio das diversas funções e composições químicas do corpo (p.ex., temperatura, pulso, pressão arterial, taxa de açúcar no sangue etc.) Homeostase é, pois a propriedade de um sistema aberto, seres vivos especialmente, de regular o seu ambiente interno de modo a manter uma condição estável, mediante múltiplos ajustes de equilíbrio dinâmico controlados por mecanismos de regulação interrelacionados.

Hormônios: Substâncias produzidas em zonas anatômicas e histologicamente definidas do organismo – órgãos endócrinos – que alcançam seus órgãos através do sangue, com influência no metabolismo em pequenas concentrações.

Hormônios esteróides: Derivados do Estrano. Pertencem a este grupo os estrógenos, gestágenos, andrógenos, glucocorticóides, mineralocorticóide, colecalciferol e derivados. A excreção acontece em 30-60% por via renal e 10% por via digestiva. O restante é reabsido na circulação enterohepática.

Hormônios sexuais: Servem as funções sexuais e são responsáveis pelo desenvolvimento das características sexuais masculinas e femininas. Os hormônios femininos – o andrógeno e progesterona (gestágenos) – são produzidos nos ovários, na placenta e supra-renais. Os masculinos, andrógenos, especialmente a testosterona é produzida principalmente nos testículos.

Síndrome de Rotor: Semelhante á síndrome de Dubin-Johnson com alteração excretórias hepáticas. Ingestão hormonal contra-indicada!