Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

**Avaliação da atividade estrogênica das águas do rio Itapecuru no município de
Bacabeira-MA**

Raphael Teixeira Verbinnen

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos – SP
2014

Raphael Teixeira Verbinnen

**Avaliação da atividade estrogênica das águas do rio Itapecuru no município de
Bacabeira-MA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientadora: Prof^ª. Dr^a. Eny Maria Vieira

Ao meu eterno e querido padrinho Hailton Miranda Teixeira.
(em memória)

AGRADECIMENTOS

À grande e querida família Miranda Teixeira, adorável refúgio, rocha forte, base da minha educação. E à pequena, mas não menos importante, família Teixeira Verbinnen, minha origem, minha vida.

A Camila Domingues, salvadora de minha pátria, companheira amiga e grande colaboradora.

À Profa. Dra. Eny Maria Vieira que me acolheu, acreditou em meu trabalho e sempre esteve disposta a me orientar quando tudo parecia perdido.

Aos colegas e amigos do Grupo de Química Analítica Aplicada a Medicamentos e a Ecossistemas Aquáticos e Terrestres (IQSC-USP) pelos auxílios prestados e bons momentos do grupo.

À Companhia de Saneamento Ambiental do Maranhão (CAEMA) pela colaboração.

À equipe do laboratório da ETA do Sistema Produtor de Água ITALUIS - CAEMA.

Ao Prof. Dr. Ricardo Luvizotto Santos, coordenador do Laboratório de Ecotoxicologia Aquática (UFMA), à Profa. Dra. Gilvanda Silva Nunes, coordenadora do Núcleo de Análises de Resíduos de Pesticidas (UFMA), e aos membros de ambos os grupos, que muito contribuíram com a pesquisa.

Aos amigos Ana Luiza, Claudinei, Eliane, Guilherme, Gustavo, Iranaldo, Luciana, Rodrigo, Thiessa, Ubarana, Ulisses, Yuri.

Ao Instituto de Química de São Carlos (USP) pela oportunidade, auxílio e colaboração.

A todos que de algum modo foram importantes colaboradores na realização e conclusão da pesquisa.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

“When the well is dry, we know the worth of water.”

Benjamin Franklin
Poor Richard's Almanac - 1732

RESUMO

O rio Itapecuru foi investigado quanto a sua atividade estrogênica por meio das técnicas de ecotoxicologia aquática e de cromatografia líquida. No município de Bacabeira, amostras de água do rio Itapecuru foram coletadas no ponto de captação do sistema de abastecimento público de água que atende cerca da metade da população de São Luís, capital do Maranhão. Elas foram utilizadas na realização de ensaios ecotoxicológicos crônicos de 21 dias com *Danio rerio* e *Oreochromis niloticus*. A VTG nestes organismos-teste foi quantificada por meio do ensaio imunoenzimático ELISA, cujos resultados indicaram a indução de VTG em machos de ambas as espécies. Portanto, a água do rio Itapecuru continha substâncias em concentração suficiente para causar alterações endócrinas no sistema sexual reprodutivo de *Danio rerio* e de *Oreochromis niloticus*. Para investigação da ocorrência de 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2), foi desenvolvido um método analítico que utilizou a extração em fase sólida seguida da análise cromatográfica líquida de alta eficiência acoplada a um detector de fluorescência. O método foi validado e demonstrou-se ser seletivo, preciso (E2 = 3,08% e EE2 = 2,26%), exato (E2 = 78,05% e EE2 = 92,26%) e com recuperação adequada (E2 = 99,24% e EE2 = 99,71%). Apresentou também LD de 6,96 e 20,78 ng.L⁻¹ e LQ de 10,36 e 29,33 ng.L⁻¹, respectivamente para E2 e EE2. A robustez, avaliada por meio do teste de Youden, mostrou os pontos robustos e os críticos do método de análise. Nas amostras de água do rio Itapecuru coletadas posteriormente aos testes ecotoxicológicos, encontrou-se EE2, sendo 13,48 ng.L⁻¹ em uma e abaixo do LQ na outra. O estrógeno E2 não foi encontrado em quaisquer das amostras.

Palavras-chave: Cromatografia líquida. Ecotoxicologia aquática. Desregulação endócrina. Estrógenos.

ABSTRACT

The Itapecuru river (Maranhão, Brazil) was investigated regarding its estrogenic activity by means of aquatic ecotoxicology and liquid chromatography. At Bacabeira, water samples were collected at the river Itapecuru uptake point of the public water supply system that serves about half the population of Sao Luis, Brazil. Using them, we performed 21 days chronic ecotoxicological tests using *Danio rerio* and *Oreochromis niloticus*. In these test organisms, VTG was quantified by means of enzyme-linked immunosorbent assay ELISA, whose results indicated the induction of VTG in males of both species. Therefore, the Itapecuru river water had substances in concentration sufficient to cause endocrine disruption in the reproductive system of *Danio rerio* and *Oreochromis niloticus*. To investigate the occurrence of 17 β -estradiol (E2) and 17 α -ethinylestradiol (EE2) in that same river, we developed an analytical method using solid phase extraction followed by high performance liquid chromatography coupled to a fluorescence detector. The method was validated and shown to be selective, precise (E2 = 3.08% and EE2 = 2.26%), exact (E2 = 78.05% and EE2 = 92.26%) and with suitable recovery (E2 = 99.24% and EE2 = 99.71%). LOD of 6.96 and 20.78 ng.L⁻¹ and LOQ of 10.36 and 29.33 ng.L⁻¹ were found, respectively to E2 and EE2. The robustness was assessed by Youden test and highlighted the robust and the critical points of the chromatographic method. In two of the water samples analyzed from Itapecuru River, EE2 was found, one of it with 13.48 ng.L⁻¹ and the another below the LOQ. E2 was not detected in any of the samples.

Keywords: Liquid chromatography. Aquatic Ecotoxicology. Endocrine disruption. Estrogens.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema ilustrativo de desregulação endócrina segundo a teoria “chave-fechadura”.	12
Figura 2 - Situação geográfica da estrutura do Italuís. Em destaque a captação de água do Rio Itapecuru e a Estação de Tratamento de Água (ETA). As linhas tracejadas (- - -) indicam o sentido da vazão de água.....	18
Figura 3 - Situação geográfica dos municípios de São Luís (B) e de Bacabeira (A) no Estado do Maranhão.....	19
Figura 4 - Bacia Hidrográfica do Itapecuru. No detalhe as divisões entre os cursos Alto, Médio e Baixo.	20
Figura 5 - Diagrama unifilar do Rio Itapecuru, destacando os principais tributários, as sedes municipais instaladas às margens e o ponto de captação Italuís. As setas indicam a direção da vazão de água e a margem pela qual interagem com o rio.....	21
Figura 6 - Exemplos de <i>Danio rerio</i> . Macho, em cima com aspecto dourado, e fêmea, abaixo com tom prateado.	26
Figura 7 - Ilustração e foto de <i>Oreochromis niloticus</i>	27
Figura 8 - Placa de poliestireno (96 poços) utilizado na análise ELISA.	30
Figura 9 - Aquários durante o ensaio ecotoxicológico com <i>Danio rerio</i> em laboratório.	33
Figura 10 - Tanques de criação de peixes mantidos pelo Laboratório de Ecotoxicologia Aquática (UFMA).....	35
Figura 11 - Distância entre a captação da água e o ponto de instalação do tanque-rede (a). No detalhe, foto de tanque-rede durante o ensaio no período chuvoso. A linha tracejada (- - -) indica o sentido da vazão de água.	35
Figura 12 - Etapas do preparo de extrato de <i>Danio rerio</i> para ELISA.	36
Figura 13 - Representação esquemática do princípio para ELISA tipo “sanduíche”.	37
Figura 14 - Representação esquemática do princípio para ELISA tipo captura indireta.....	39
Figura 15 - Comparação das variáveis cor, turbidez e pH da água do rio Itapecuru entre os períodos 1 e 2.....	42
Figura 16 - Curvas analíticas (absorbância x concentração em $\mu\text{g.L}^{-1}$) para o cálculo de concentração de VTG em <i>Danio rerio</i> . As barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha = 0,05$) em cada ponto da curva.	44
Figura 17 - Box-plot, organizado por período e sexo, das concentrações ($\mu\text{g VTG g}^{-1}$ peixe) de VTG encontradas em exemplares de <i>Danio rerio</i> submetidos a ensaio crônico de 21 dias.....	45
Figura 18 - <i>O. niloticus</i> com incisão para dissecação (a = testículo; b = ovário; c = fígado)..	47
Figura 19 - Box-plot, organizado por período e sexo, das absorbâncias (492 nm) de VTG encontradas em exemplares de <i>Oreochromis niloticus</i> submetidos a ensaio crônico de 21 dias.....	47
Figura 20 - Estrutura molecular dos hormônios estrógenos analisados e do colesterol.	51
Figura 21 - Diagrama esquemático do detector de fluorescência Agilent 1200 series, modelo G1321A.	55
Figura 22 - Espectros de emissão e de excitação dos estrógenos. No detalhe o ápice dos espectros evidenciando o comprimento de onda.	72

Figura 23 - Comparação da exatidão entre o uso de HCl e H ₂ SO ₄ na acidificação da amostra-testemunha fortificada com 400 µg.L ⁻¹ de E2 e EE2.....	74
Figura 24 - Exatidão observada para cada membrana filtrante testada. Amostra-testemunha fortificada com 400 µg.L ⁻¹ de E2 e EE2.	74
Figura 25 - Comparação das tendências entre o uso de ACN e MeOH como solventes de condicionamento e de eluição, com e sem lavagem de cartucho SPE. Amostra-testemunha fortificada com 400 µg.L ⁻¹ de E2 e EE2.....	75
Figura 26 - Fluxograma do método SPE/HPLC-FLD para análise de E2 e EE2.	76
Figura 27 - Curvas analíticas do método e gráfico de resíduos da concentração (eixo x) para cada estrógeno. Condições cromatográficas: FM ACN:H ₂ O (gradiente), vazão: 1 mL.min ⁻¹ , vol. injeção de 20 µL, λ _{Ex} = 255 nm, λ _{Em} = 315 nm, temp. = 40 °C. ...	77
Figura 28 - Representação gráfica da faixa linear do método através da razão resposta analítica/concentração vs. concentração em escala logarítmica.	77
Figura 29 - Sobreposição de cromatogramas demonstrando a seletividade do método. Condições cromatográficas: FM ACN:H ₂ O (gradiente), vazão: 1 mL.min ⁻¹ , vol. injeção de 20 µL, λ _{Ex} = 255 nm, λ _{Em} = 315 nm, temp. = 40 °C.....	78
Figura 30 - Diagramas de efeito do teste de robustez (Youden).	79
Figura 31 - Variação de recuperação em função de dias de conservação de analitos em cartucho SPE. Armazenamento sob refrigeração a 4 °C.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição do branco (B), dos padrões (P) e das amostras (A) nas placas usadas na análise ELISA para <i>D. rerio</i>	38
Tabela 2 - Distribuição do branco (B), do controle positivo (+) e das amostras (A) nas placas usadas na análise ELISA para <i>O. niloticus</i>	40
Tabela 3 - Etapas na análise estatística dos dados dos ensaios ecotoxicológicos.	41
Tabela 4 - Valores médios de pH, OD e condutividade da água do rio Itapecuru medidos durante os ensaios.	43
Tabela 5 - Principais características dos estrógenos.	51
Tabela 6 - Procedimentos SPE que serviram de base para o trabalho.	58
Tabela 7 - Fatores estudados no preparo de amostras: acidificação, filtração e SPE.	59
Tabela 8 - Fatores estudados no estabelecimento de condições cromatográficas.	60
Tabela 9 - Média dos indicadores de qualidade de água: turbidez, cor e pH das amostras do córrego Monjolinho e do rio Itapecuru.	61
Tabela 10 - Parâmetros selecionados para verificação de robustez segundo teste de Youden.	64
Tabela 11 - Planejamento experimental para teste de robustez conforme Youden.	65
Tabela 12 - Datas de coleta das amostras de água do rio Itapecuru, organizadas por hora e período.	70
Tabela 13 - Condições cromatográficas testadas no desenvolvimento do método.	72
Tabela 14 - Condições cromatográficas do método.	73
Tabela 15 - Resultados das figuras de mérito da validação do método.	76
Tabela 16 - Visualização dos parâmetros influenciados pelos diferentes fatores através do teste de robustez (Youden).	79
Tabela 17 - Indicadores de qualidade das amostras de água coletadas no rio Itapecuru e resultados das determinações de estradiol e etinil-estradiol.	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas	LD	tandem limite de detecção
ACN	acetonitrila	LQ	limite de quantificação
ACT	acetona	MeOH	metanol
C ₁₈	octadecilsilano	MS	mass spectrometer (espectrômetro de massas)
DAD	detector de arranjo de diodos	MS ²	MS em tandem
DCM	diclorometano	NARP	Núcleo de Análises de Resíduos de Pesticidas
DE	desregulador(es) endócrino(s)	OD	oxigênio dissolvido
DPR	desvio-padrão relativo	OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico)
E2	17β-estradiol	PNRH	Plano Nacional de Recursos Hídricos
EE2	17α-etinilestradiol	SPE	solid phase extraction (extração em fase sólida)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	temp	temperatura
ETA	Estação de Tratamento de Água	t _R	tempo de retenção
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto	UFMA	Universidade Federal do Maranhão
FDA	Food and Drug Administration	uH	unidade Hazen de cor
FLD	detector de fluorescência	USEPA	Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)
GC	cromatografia a gás	USP	Universidade de São Paulo
GL	graus de liberdade	uT	unidade de turbidez
Hex	hexano	UV	ultravioleta
HPLC	high-performance liquid chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)	VTG	vitelogenina
IPCS	International Programme on Chemical Safety (Programa Internacional de Segurança Química)		
IQSC	Instituto de Química de São Carlos		
LC-MS ²	cromatógrafo a líquido acoplado a espectrômetro de massas em		

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	3
LISTA DE TABELAS	5
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	6
APRESENTAÇÃO	11
CAPÍTULO I	11
1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Desregulação Endócrina	12
1.2 Efeitos em Peixes e a Problemática Ambiental.....	13
1.3 Fontes de Estrógenos e Poluição Hídrica.....	15
2 ÁREA DE ESTUDO	18
2.1 Bacia Hidrográfica do Rio Itapecuru	19
3 ECOTOXICOLOGIA.....	23
3.1 Organismos-teste	25
3.1.1 PAULISTINHA (<i>Danio rerio</i>).....	25
3.1.2 TILÁPIA-DO-NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	26
3.2 Vitelogenina	27
4 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	29
5 OBJETIVO	31
6 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
6.1 Ensaio Ecotoxicológico	32
6.1.1 PAULISTINHA (<i>Danio rerio</i>).....	32
6.1.1.1 Seleção e preparo de organismos-teste	32
6.1.1.2 Realização do ensaio ecotoxicológico	33
6.1.2 TILÁPIA-DO-NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	34
6.1.2.1 Seleção e preparo de organismos-teste	34
6.1.2.2 Realização do ensaio ecotoxicológico	35
6.1.3 TÉRMINO DO ENSAIO CRÔNICO.....	36
6.2 Análise ELISA	36
6.2.1 PREPARO DE EXTRATOS PARA ELISA	36
6.2.2 PAULISTINHA (<i>Danio rerio</i>).....	37
6.2.3 TILÁPIA-DO-NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	39
6.2.4 ANÁLISE DOS DADOS.....	41
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
7.1 Ensaio Ecotoxicológico	42

7.2 Paulistinha (<i>Danio rerio</i>)	43
7.3 Tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	46
CAPÍTULO II	50
1 HORMÔNIOS ESTRÓGENOS	50
1.1 Características Físicas e Químicas.....	51
1.2 Métodos de Análise.....	52
1.3 Fluorescência e Detecção de Estrógenos.....	53
2 OBJETIVO	56
3 MATERIAL E MÉTODOS	57
3.1 Preparo de Amostra	57
3.2 Sistema Cromatográfico.....	59
3.3 Validação do Método Cromatográfico	60
3.3.1 PRECISÃO	61
3.3.2 SELETIVIDADE	62
3.3.3 EXATIDÃO E RECUPERAÇÃO.....	63
3.3.4 ROBUSTEZ.....	64
3.3.5 LINEARIDADE, SENSIBILIDADE E FAIXA DE TRABALHO	66
3.3.6 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)	67
3.4 Conservação e Transporte de Amostras do Rio Itapecuru.....	69
3.5 Coleta de Amostras do Rio Itapecuru	70
3.6 Destinação de Resíduos	71
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
4.1 Análise Cromatográfica	72
4.2 Preparo de Amostra	73
4.3 Validação	76
4.4 Conservação da Amostra e Estabilidade dos Analitos.....	80
4.5 Análise de Amostras do Rio Itapecuru.....	81
5 CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	85
APÊNDICE 1 - Dados dos processos dos Testes de Normalidade Shapiro-Wilk (P=0,05) para <i>Danio rerio</i> , por meio do suplemento Action® (versão 2.5.197.344, Estatcamp, Brasil) para Excel.....	94
APÊNDICE 2 - Dados dos processos dos Testes de Homocedasticidade Levene (P=0,05) para <i>Danio rerio</i> , por meio do suplemento Action® (versão 2.5.197.344, Estatcamp, Brasil) para Excel. (continua).....	97

APÊNDICE 3 - Dados dos processos dos Testes de Normalidade Shapiro-Wilk ($P=0,05$) para <i>Oreochromis niloticus</i>, por meio do suplemento Action® (versão 2.5.197.344, Estatcamp, Brasil) para Excel.	98
ANEXO A - Climatologia (temperatura mínima, temperatura máxima e precipitação) no município de Bacaneira, MA.	99

APRESENTAÇÃO

A tese está dividida em 2 capítulos. No primeiro capítulo, o leitor é inserido no contexto de realização da pesquisa, sendo apresentadas informações sobre a problemática acerca da desregulação endócrina e sobre a região de estudo. Conjuntamente, discorre-se sobre o desenvolvimento dos estudos ecotoxicológicos, abordando os fundamentos do trabalho, a metodologia, os resultados e respectivas conclusões. O Capítulo II trata da pesquisa em química analítica instrumental, sendo apresentados o desenvolvimento do método, a validação e os resultados das análises cromatográficas das amostras obtidas no monitoramento da água do rio Itapecuru.

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A história do surgimento e entendimento da problemática acerca de substâncias consideradas desreguladoras endócrinas, permeia-se através de acontecimentos históricos dos Estados Unidos a partir da década de 1960. Dois livros publicados naquele país, nos anos de 1962 e 1996, trouxeram à tona informações importantes e preocupantes acerca da contaminação do meio-ambiente e de efeitos toxicológicos. O primeiro, *Silent Spring* (CARSON, 1962), alertou sobre a degradação do meio ambiente por substâncias orgânicas, apresentando diclorodifeniltricloroetano (DDT) como o principal causador. O segundo, *Our Stolen Future* (COLBORN; DUMANOSKI; MYERS, 1996), considerado a continuação do anterior, relata, com mais detalhes e com base em diferentes pesquisas científicas, casos em que certas substâncias orgânicas, principalmente as sintéticas e os agrotóxicos, apresentaram forte evidência de causar efeitos adversos a animais e a humanos.

Numa época em que a preocupação com a poluição do meio ambiente era crescente na população norte-americana, o livro de Carson (1962) de certa forma contribuiu para a criação, em 1970, da Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, USEPA). Este ato foi parte da resposta do governo daquele país frente à inquietação de seu povo (WISMAN, 1985).

Em 1996, mesmo ano de publicação do livro de Colborn, Dumanoski e Myers (1996), o Programa de Triagem de Desreguladores Endócrinos (Endocrine Disruptor Screening Program, EDSP) foi implantado na USEPA. Ele surgiu após cientistas apresentarem

evidências convincentes de que certas substâncias químicas eram as responsáveis por desregular o sistema endócrino de humanos e da vida selvagem (UNITED STATES..., 2013).

1.1 Desregulação Endócrina

A desregulação do sistema endócrino ocorre quando certas substâncias, aqui denominadas desreguladoras, imitam, bloqueiam ou provocam colapso dos hormônios essencialmente esteróides, ou seja, que derivam do colesterol. Ela pode estar associada a qualquer uma das etapas de regulação hormonal, acarretando resposta fraca ou forte e por fim resultando em um sinal irregular ao organismo (NOGUEIRA, 2003; GHISELLI; JARDIM, 2007; LINTELMANN et al, 2003).

Quando a ação do hormônio aguardado pelo receptor é simulada por um desregulador (Figura 1), o sinal ao organismo é ampliado, sendo o fenômeno denominado de efeito agonista. No caso contrário, em que a interação hormônio-receptor é impedida ou diminuída, resultando em redução ou anulação do estímulo ao organismo, têm-se o efeito antagonista (NOGUEIRA, 2003; LINTELMANN et al, 2003).

Figura 1 - Esquema ilustrativo de desregulação endócrina segundo a teoria “chave-fechadura”.

Diversos autores têm proposto diferentes definições para desregulador endócrino. Os termos hoje empregados no Brasil resultam da tradução para o português, feita por diferentes pesquisadores. Desta forma, podem ser encontradas as seguintes denominações: perturbadores endócrinos, disruptivos ou disruptores endócrinos, desreguladores endócrinos, interferentes endócrinos, dentre outras (BILA; DEZOTTI, 2007; REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006; GHISELLI; JARDIM, 2007).

Existem diversas definições para desreguladores endócrinos (DE), uma delas, adotada pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS - International Programme on Chemical Safety), em conjunto com o Japão, os EUA, o Canadá, a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, do inglês Organisation for Economic

Co-operation and Development) e a União Européia, define da seguinte maneira.

Um desregulador endócrino é uma substância ou um composto exógeno que altera uma ou várias funções do sistema endócrino e tem, consequentemente, efeitos adversos sobre a saúde de um organismo intacto, sua descendência, ou subpopulações (COMMISSION..., 1999, p. 6).

Segundo Nogueira (2003), os principais fatores influenciadores da desregulação endócrina são: natureza, concentração, tipo de interação, tempo de exposição, fatores genéticos, idade e sexo.

O sistema endócrino é um mecanismo complexo composto por glândulas, hormônios e receptores e está presente em mamíferos, aves, peixes e em alguns outros tipos de organismos vivos. Hormônios liberados por glândulas endócrinas coordenam e regulam a comunicação entre as células, sendo responsável por funções biológicas, como reprodução, desenvolvimento embrionário, crescimento, metabolismo e homeostase (GREENSPAN; GADNER, 2004; REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006, LINTELMANN et al, 2003).

Cada glândula endócrina secreta um certo tipo de hormônio que tem ação específica sobre dado tipo de célula ou tecido, dependendo para isso que um receptor esteja presente. A corrente sanguínea é o meio usado para o transporte dos hormônios até os receptores nas células-alvo (GUIMARÃES, 2005; GREENSPAN; GARDNER, 2004).

Em função da forma como são transmitidos e recebidos pelas células-alvo, são genericamente diferenciados dois tipos de hormônios presentes nos animais: os de origem protéica, que dependem de receptores para exercerem alguma ação sobre as células, e os hormônios esteróides, que além de não dependerem de receptores, suas dimensões e lipofilicidade favorecerem ações intracelulares (NOGUEIRA, 2003).

O sistema endócrino também se relaciona com os sistemas imunológico e nervoso. O hipotálamo, por exemplo, centro nervoso localizado abaixo do cérebro, controla as quantidades de hormônios secretadas pelas demais glândulas, estas por sua vez estão sujeitas a complexos mecanismos que regulam: a ação dos receptores; a síntese, a liberação, o transporte e o metabolismo dos hormônios; bem como o acesso destes ao interior das células-alvo (GUIMARÃES, 2005; GREENSPAN; GARDNER, 2004).

1.2 Efeitos em Peixes e a Problemática Ambiental

No ambiente aquático, a presença de alguns DE pode ser constante, não devido à longa meia-vida, ou porque não se degradam, mas devido à sua permanente introdução no ambiente. É o caso de alguns DE de atividade estrogênica, como hormônios estrógenos naturais

(MCGOVERN; MCDONALD, 2003). Em se tratando de potencial efeito desregulador, fatores como lipofilicidade, persistência, bioacumulação, tempo de exposição, mecanismos de biotransformação e de excreção tem que ser levados em consideração (BIRKETT; LESTER, 2003; MCGOVERN; MCDONALD, 2003).

Um importante grupo capaz de desregular o sistema endócrino são as substâncias que mimetizam os efeitos de estrógenos, comumente denominadas xenoestrogênios. Estrogênios são hormônios responsáveis pelas características sexuais femininas em organismos sexuais, tendo como principal representante o estrógeno natural 17β -estradiol. Apresentam efeito em múltiplos locais, influenciando desde o comportamento instintivo até o ciclo reprodutivo (GEYER et al., 2000).

Em peixes, a desregulação endócrina causada por xenoestrogênios foi correlacionada a feminização (RODGER-GRAY et al., 2001), alteração nas gônadas (PANTER et al., 1999), hermafroditismo (KOGER et al., 2000), incidência de testículos-óvulos nas gônadas (KANG et al., 2002) e indução à síntese de vitelogenina (PANTER et al., 1999, ROSE et al., 2002; GORDON et al., 2006; HINCK et al., 2006; REMPEL et al., 2006). Estudos feitos por Sumpter e Johnson (2005), tanto em laboratório quanto em campo, demonstraram que concentrações na faixa de ng.L^{-1} afetam o desenvolvimento de peixes.

Para análise eficiente de como determinada substância irá agir fisiologicamente em um organismo, o mais indicado é utilizar os métodos analíticos juntamente com os biomarcadores (BUSS et al., 2003; ARIAS et al., 2007).

Biomarcadores são definidos como indicadores biológicos resultantes de exposição a estressores, apresentando-se como resposta adaptativa evidenciada por alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou comportamentais (ZAGATTO; BERTOLETTI; 2008).

A proteína vitelogenina (VTG) demonstra bons resultados e é frequentemente usada como biomarcador quando o intuito da pesquisa é verificar efeitos estrogênicos de desreguladores endócrinos (ARUKWE; GOKSOYR, 2003; GORDON et al., 2006; HINCK et al., 2006; REMPEL et al., 2006). Ela é produzida no fígado de animais, por meio do estímulo causado pela presença do estrógeno 17β -estradiol, para compor o vitelo presente nos ovócitos (ARUKWE; GOKSOYR, 2003; LANGSTON et al., 2005).

A síntese da VTG depende da presença de hormônios estrogênicos, que são sintetizados por fêmeas durante seu ciclo reprodutivo. Embora peixes machos e juvenis também apresentem receptores estrogênicos hepáticos, a produção de proteínas ligadas à ovogênese e vitelogênese não é normal neste gênero. Este é um sinal de desequilíbrio

endócrino e indicador de efeito por exposição a estrógenos ambientais; tendo em vista que sua presença em machos, só é possível mediante indução externa por meio de xenoestrogênio (LINTELMANN et al., 2003; HORNUNG et al., 2004; HINCK et al., 2006; REMPEL et al., 2006).

Com base nestas informações, a VTG mostra-se um biomarcador adequado para avaliar a exposição de vertebrados a hormônios femininos naturais ou a substâncias que mimetizam a ação de hormônios. Os peixes são importantes nos estudos relativos aos efeitos de substâncias estrogênicas à fisiologia da reprodução, pois seu sistema reprodutivo é regulado por hormônios similares aos dos mamíferos, portanto acredita-se que os efeitos encontrados naqueles também possam ocorrer nestes (MILLS; CHICHESTER, 2005).

1.3 Fontes de Estrógenos e Poluição Hídrica

O lançamento de esgotos sanitários sem tratamento prévio em cursos d'água implica em sua contaminação por diversas substâncias. Dentre os contaminantes podem estar presentes os xenobióticos, conhecidamente de ação desreguladora do sistema endócrino, e que podem ter origem natural ou de atividade antropogênica (LIVINGSTONE, 1998).

Algumas destas substâncias possuem efeitos estrogênicos e são encontradas em esgotos, como por exemplo, hormônios estrógenos naturais ou sintéticos, pesticidas, aditivos plásticos, alquilfenóis, bifenilas policloradas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, retardantes de chamas e outros (ALDA; BARCELÓ, 2000; AERNI et al, 2004; GHISELLI; JARDIM, 2007).

Um grupo destas substâncias tem efeitos relacionados à característica sexual feminina e podem ser de origem antrópica, denominadas xenoestrogênios, ou de origem natural. Portanto, constituem classe de substâncias que são definidas por seus efeitos biológicos e não pela natureza química (GHISELLI; JARDIM, 2007).

As principais fontes para aporte dos hormônios femininos, considerados de maior potencial desregulador, nos corpos hídricos, são os esgotos sanitários e industriais lançados sem ou mesmo após tratamento, como também as áreas de agricultura que utilizam lodo, oriundo de estação de tratamento de esgoto (ETE), como condicionador de solo (REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006).

O Plano Nacional de Recursos Hídricos (PNRH), na seção referente à qualidade da água superficial, concluiu em 2006, que uma das principais fontes que alteram a qualidade das águas do país, e principal problema observado em todas as regiões hidrográficas, eram os esgotos sanitários, sendo mais crítico nas regiões metropolitanas (MINISTÉRIO DO MEIO...,

2006b).

Pesquisa realizada com os gestores ambientais dos municípios brasileiros, revelou que, o principal problema de qualidade da água tem sido o lançamento de esgotos sanitários, já que, em 2006, apenas 47% dos municípios brasileiros possuíam rede coletora de esgoto, e somente 18% dos esgotos recebem algum tratamento. É importante ressaltar que, embora seja em muitos casos mais perceptível a poluição em centros urbanos, a zona rural também é atingida (MINISTÉRIO DO MEIO..., 2006b).

Dados mais recentes, consolidados pelo Ministério das Cidades, revelam que a quantidade de esgotos coletados e tratados nos municípios brasileiros pouco alterou. O índice de coleta de esgotos no Brasil ficou em 48,1%, enquanto o tratamento destes, em 37,5% (SECRETARIA NACIONAL..., 2013).

Portanto, em se tratando de desreguladores endócrinos, precisamente de hormônios estrógenos, a principal via de contaminação hídrica são os esgotos sanitários. Deste modo, observa-se que as fontes de captação de água passíveis de potabilização são continuamente contaminadas com despejos in natura, enquanto os tratamentos de água potável mais comuns, e ditos convencionais, nem sempre tem eficiência para remoção suficientemente segura destes contaminantes (BILA; DEZOTTI, 2007).

Entre os principais problemas relacionados à água na América do Sul estão: o crescimento da urbanização, com consequente aumento da demanda de água; o aumento da deterioração da qualidade de água; o aumento da quantidade de efluentes superficiais, além do incremento de resíduos sólidos. Estas foram, portanto, as questões apontadas como fatores importantes na superposição de áreas de pobreza, na degradação ambiental e na ausência de infraestrutura sanitária (LOBATO, 2008).

É importante ressaltar que a persistência da atividade dos estrogênios ocorre em decorrência de serem continuamente introduzidos no ambiente. Estudos relatam que até 40% das doses ministradas de estrógenos sintéticos podem ser disponibilizadas para o ambiente (REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006).

Grande parte dos estrógenos é metabolizada pelo fígado, o que auxilia na manutenção do equilíbrio hormonal por meio da decomposição do estrógeno e de outros hormônios esteróides, a fim de permitir sua excreção na forma inativa, conjugada como glucuronídeos e sulfatos. Curiosamente, a ação de enzimas produzidas por bactérias comumente encontradas em áreas de despejo de efluentes, por exemplo de ETE, prontamente os biotransformam em compostos biologicamente ativos e passíveis de desencadear efeitos deletérios (REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006; GUIMARÃES, 2005; PANTER et al, 1999).

Contudo, mesmo com o potencial risco à saúde apresentado por estas substâncias, atualmente não há, no mundo, legislação que as considere poluentes ambientais. Do ponto de vista de efeitos deletérios dos estrógenos à saúde humana, existe, em âmbito legal e regulamentar, um posicionamento apenas da agência norte-americana de regulamentação *Food and Drug Administration* (FDA). Desde 2003, a FDA recomenda a não utilização de hormônios estrógenos em terapia de reposição hormonal como forma de prevenção de doenças cardíacas (ROZENFELD, 2007), tendo em vista que estudos mostraram não haver prevenção destas, além de aumentar o risco de acidente vascular cerebral.

2 ÁREA DE ESTUDO

Desde 1983, o município de Bacabeira, MA, passou a ter grande importância para os habitantes da cidade de São Luís, pois naquele ano foi inaugurado o Sistema Produtor de Água denominado Italuís. Hoje vizinho ao município de São Luís, Bacabeira, cuja municipalização ocorreu em 1994, ainda era um povoado pertencente ao município de Rosário à época da inauguração do Italuís (INSTITUTO BRASILEIRO..., 2013).

Distante cerca de 60 km de São Luís, capital do Estado do Maranhão, o Sistema Italuís capta água do rio Itapecuru ($3^{\circ}3'43,34''\text{S}$; $44^{\circ}15'14,21''\text{O}$) e a trata em sua estação de tratamento de água (ETA, $3^{\circ}1'39,4''\text{S}$; $44^{\circ}18'32,9''\text{O}$) distante 7,5 km da captação (Figura 2), garantindo o fornecimento de água potável a grande parte da população de São Luís (SILVA et al, 2005b). Em 2005, este sistema correspondia a cerca de 60% do total de água disponibilizada ao consumo humano pela Companhia de Saneamento Ambiental do Maranhão (CAEMA), concessionária de abastecimento público de água do Estado e administradora do Italuís (SILVA et al, 2005a).

Fonte: Bing Maps (2014).

Figura 2 - Situação geográfica da estrutura do Italuís. Em destaque a captação de água do Rio Itapecuru e a Estação de Tratamento de Água (ETA). As linhas tracejadas (- - -) indicam o sentido da vazão de água.

São Luís está localizada na Ilha do Maranhão, que faz parte do Golfão Maranhense (Figura 3), onde se encontram diferentes ecossistemas, tais como manguezais, praias, dunas fixas e móveis, rios, entre outros. A sudoeste da ilha, na região mais próxima ao continente, o

município faz fronteira com Bacabeira por onde passa a única estrada (BR-135) que permite acesso terrestre à ilha, por meio da ponte sobre o Estreito dos Mosquitos.

Figura 3 - Situação geográfica dos municípios de São Luís (B) e de Bacabeira (A) no Estado do Maranhão.

Fonte: Google Maps (2014) e Abreu (2006).

Tipicamente estuarina, a região recebe afluentes de bacias de grandes rios. A leste da ilha encontra-se as Baías do Arraial e de São José, onde deságuam os rios Itapecuru e Munim, respectivamente, e a oeste, a baía de São Marcos, onde deságuam os rios Mearim e Pindaré. Em função de concentrações demográficas na região destas baías, ambas têm influência de atividades antropogênicas, portuárias e industriais, não só da cidade de São Luís, como também de várias outras situadas ao longo das bacias hidrográficas destes rios (MMT PLANEJAMENTO E CONSULTORIA, 2007).

2.1 Bacia Hidrográfica do Rio Itapecuru

Abrangendo uma área de 52.972,1 km², a bacia hidrográfica do rio Itapecuru corresponde a cerca de 16% das terras do Maranhão. Principal constituinte da sua bacia hidrográfica, o rio Itapecuru, ao longo de seu percurso, recebe a contribuição de vários outros rios, que transmitem a ele suas características e os materiais dispersos em seu leito (ALCÂNTARA, 2004).

De origem indígena, a palavra “itapecuru” significa “caminho da pedra grande”. O rio Itapecuru nasce no complexo formado pelas serras de Crujeiras, Itapecuru e Alpercatas, a cerca de 500 metros de altitude, na região dos limites dos municípios de Mirador, Grajaú e

São Raimundo das Mangabeiras, e dentro do Parque Estadual do Mirador. Após percorrer cerca de 1.050 km, deságua na Baía do Arraial, a leste da Ilha de São Luís (ALCÂNTARA, 2004; SILVA et al, 2005b).

Em virtude principalmente de suas variações de altitude e vazão, o rio é dividido em Alto, Médio e Baixo (Figura 4).

Figura 4 - Bacia Hidrográfica do Itapecuru. No detalhe as divisões entre os cursos Alto, Médio e Baixo.

Fontes: Programa de Planejamento... (2006) e Bacia do Rio Itapecuru (2014).

O Alto Itapecuru é a região com menor densidade populacional, entretanto apresenta as maiores áreas desmatadas, em grande parte devido à cultura da soja. Similarmente, o Médio Itapecuru também conta com grandes áreas descobertas como resultado principalmente da atividade agropastoril. Já o Baixo Itapecuru recebe grande quantidade de esgotos sanitários, devido ao maior adensamento populacional (SILVA et al, 2005b).

Observando-se a Figura 5, onde se apresenta o diagrama unifilar do rio Itapecuru, é possível identificar que das 10 sedes municipais instaladas à margem do rio, sete delas estão no baixo curso, sendo que seis destas estão a montante do ponto de captação de água do Sistema Italuís.

Figura 5 - Diagrama unifilar do Rio Itapecuru, destacando os principais tributários, as sedes municipais instaladas às margens e o ponto de captação Italuis. As setas indicam a direção da vazão de água e a margem pela qual interagem com o rio.

Na bacia do Itapecuru, predomina o regime fluvial tropical, caracterizado pela existência de uma estação de águas abundantes, de fevereiro a maio, e outra de águas escassas, de agosto a novembro. Ao longo do rio existiam, em 2006, sete estações fluviométricas, estando a mais próxima da captação de água do sistema Italuis localizada no município de Cantanhede, distante cerca de 64 km. Nela a vazão média registrada do Itapecuru atinge $209 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, sendo a máxima registrada de $2.020 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, em maio de 1974, e a mínima de $36 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, em novembro de 1972 (MINISTÉRIO DO MEIO..., 2006a).

O registro atualizado destes dados é inviabilizado porque a maior parte destes postos, controlados pela Agência Nacional de Águas (ANA), possuem dados disponíveis apenas no período de 1963 até 1983 (MINISTÉRIO DO MEIO..., 2006a).

Na área da bacia do Itapecuru, estão localizados 55 municípios, cuja população, em

2011, era de 1.622.875 habitantes, de acordo com IBGE. O território de 35 destes municípios extrapola os limites da bacia hidrográfica, de modo que apenas 20 têm seu território completamente disposto na bacia (COMPANHIA DE DESENVOLVIMENTO..., 2012). Destes, 10 têm sua sede municipal localizada às margens do rio Itapecuru.

Tal urbanização lateral tem sido a principal fonte de poluição hídrica, pois tanto o esgoto “in natura” como o lixo gerado por estas comunidades são lançados diretamente na calha do rio, sem tratamento algum (SILVA et al, 2005b).

Silva et al (2005b) desenvolveram um estudo de campo com aplicação de 201 questionários a diferentes segmentos da população de seis sedes municipais marginais do baixo curso do rio Itapecuru. Em seus achados, constata-se que a precariedade ambiental do rio Itapecuru é notória, pois a maioria dos entrevistados reconhece que o lixo e os esgotos lançados nas suas margens é o principal problema, o que de fato contrasta com o principal uso de suas águas que é para a dessedentação humana.

Mais recentemente, Gomes et al (2012) relataram situação semelhante de degradação ambiental na região urbana de Codó, um dos municípios que margeiam o rio Itapecuru. Atualmente, a poluição hídrica continua igual ou pior, pois não há notícia de intervenção sanitária nos municípios com capacidade para alterar rapidamente o cenário das margens do rio.

Contudo, publicação da Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental (2013) torna evidente que este não é um problema limitado à bacia hidrográfica do Itapecuru. Nela é relatado que, em 2011, mais da metade da população brasileira (61,9%) não contava com redes para coleta de esgoto, o qual, de modo geral, acaba por ser lançado diretamente nos rios, sem qualquer tipo de tratamento.

Naquele mesmo ano, na capital do Estado do Maranhão, um pouco menos da metade da população dispunha de rede coletora de esgoto. E do total da população ludovicense, apenas 17% tinham seus esgotos tratados em estação de tratamento de esgoto (SECRETARIA NACIONAL..., 2011).

Tomando como base o ano de 2008, cerca de 55% da população brasileira não tinha acesso a redes coletoras de esgoto. Essa população correspondia a pouco menos de 105 milhões de habitantes (IBGE, 2011). Nos locais onde existe rede coletora, o destino destes resíduos são, na sua grande maioria, os rios que cortam a cidade e que em sua maioria fornecem água ao abastecimento público.

3 ECOTOXICOLOGIA

Ciência surgida a partir da associação dos conhecimentos da Ecologia e da Toxicologia, a Ecotoxicologia foi assim denominada primeiramente pelo toxicologista francês René Truhaut, em 1969. Após reuniões e discussões científicas, a definição de Ecotoxicologia foi publicada, em 1976, como sendo

a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio no qual os organismos vivem num contexto integrado (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Diferentemente da Toxicologia, que estuda os efeitos de uma determinada substância a certa espécie, e da Análise Química Ambiental, cujo foco geralmente é quantificar substâncias num determinado compartimento ambiental, a Ecotoxicologia contribui no entendimento do efeito de uma ou mais substâncias a uma população ou comunidade de organismos.

Desta forma, esta ciência permite ao pesquisador entender e prever os impactos ao ecossistema, através da identificação e da quantificação dos efeitos adversos a uma determinada população inserida naquele ecossistema (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Tais efeitos podem ser quantificados por critérios de anatomia, de fisiologia, de histologia, de patologia, de comportamento, de reprodução, de mortalidade e de alterações bioquímicas, dependendo do foco do estudo. Para decidir qual critério analisar é importante conhecer o contaminante, o organismo testado e o efeito adverso causado pela substância naquele organismo.

Portanto, quando se deseja verificar a atividade estrogênica de desreguladores endócrinos em peixes, a alteração bioquímica, que leva à feminização de organismos machos, por exemplo, é frequentemente avaliada através da medição de vitelogenina.

Em pesquisas de cunho ambiental, os testes de toxicidade, à luz de métodos de ensaio ecotoxicológico, tornam-se importantes ferramentas no entendimento dos efeitos causados por poluentes ao ecossistema. Desta forma, trazem informações complementares às obtidas no monitoramento de um compartimento ambiental, sendo, portanto, úteis na avaliação do grau de poluição de um corpo hídrico.

Vários ensaios ecotoxicológicos encontram-se bem estabelecidos, sendo que alguns estão padronizados nacional e internacionalmente por órgãos de normalização, dentre eles a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Conforme os objetivos da pesquisa, pode-se realizar testes de curto período, considerados simples, para avaliação de efeitos

agudos, ou mais complexos, de longo prazo, para avaliação de efeitos crônicos.

O ensaio agudo avalia os efeitos tóxicos severos e rápidos de um poluente a um organismo durante um curto período de sua vida, geralmente quantificando, em períodos que variam de 24 a 96 horas, os organismos-teste mortos e imóveis (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Já o crônico tem duração maior e utiliza parte ou todo o ciclo de vida de uma espécie. É importante considerar que no ambiente aquático, por exemplo, os organismos geralmente encontram-se expostos a concentrações sub-letais, por um período capaz de causar disfunções biológicas sem, no entanto, conduzir à morte precoce. O ensaio crônico de curta duração usa o estágio mais sensível ou crítico do ciclo de vida da espécie, geralmente correspondendo à fase embrionária, larval ou juvenil (GEORGETTI, 2010). Embora não seja capaz de prever danos a todo o ciclo de vida de peixes, do ponto de vista prático e econômico, podem ser eficientes para avaliar a toxicidade de efluentes, uma vez que preveem efeitos tóxicos crônicos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Tendo em vista a pesquisa aqui apresentada, na qual se avalia a atividade estrogênica da água do rio Itapecuru, entende-se que o ensaio crônico é mais adequado que o agudo, pois a alteração endócrina avaliada através da quantificação do biomarcador vitelogenina (VTG) é um efeito biológico que ocorre no organismo-teste em concentração sub-letal.

Além da duração do teste, o tipo de sistema de exposição também é importante na avaliação da toxicidade do efluente. Ele pode ser estático, semi-estático ou de fluxo contínuo, levando em conta a renovação ou troca do efluente dentro do sistema de exposição ao contaminante.

No sistema estático não há renovação da água ou do contaminante durante o ensaio e geralmente é aplicado em ensaios agudos. O semi-estático é recomendado para os ensaios em que há acumulação de excretas ou substâncias tóxicas em meio aquoso, ou ainda depleção de oxigênio, sendo, portanto, necessária a troca periódica da solução testada. Prática pouco usual e de custo elevado, o sistema de fluxo contínuo tem a solução-teste continuamente renovada, por meio do uso de bombas e medidores de vazão. É recomendado para poluentes voláteis ou instáveis, cuja estrutura molecular apresenta baixa estabilidade no meio e nas condições em que é aplicado no teste (GEORGETTI, 2010).

Ensaio ecotoxicológicos que investigam os efeitos causados por poluentes em meio aquático usam organismos representativos do corpo hídrico e permitem, por exemplo, avaliar o grau de toxicidade a que a biota está exposta. Em função do objetivo da pesquisa, tais ensaios podem ser utilizados para fins diversificados, dentre eles para a avaliação da

qualidade das águas. Sendo este o objetivo principal do presente trabalho, será verificado o grau de desregulação endócrina causada pela água do rio Itapecuru aos organismos-teste *Danio rerio* e *Oreochromis niloticus* (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

3.1 Organismos-teste

Além de ter considerável sensibilidade a substâncias de interesse ao ensaio, um organismo-teste que apresenta condições, ou técnica existente, para seu cultivo em laboratório é altamente desejável. Ademais, características como pequeno porte na maturidade, ciclo de vida não muito longo e disponibilidade contínua de exemplares são ideais para ensaios ecotoxicológicos. Outra recomendação é o uso de espécie com estabilidade genética e de ampla distribuição geográfica (ORGANISATION FOR ECONOMIC..., 2004; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Pode ser considerado utópico que uma única espécie de peixe seja representativa de todos os peixes, o alto custo de ensaios ecotoxicológicos requer o ajuste destes a uma ou algumas poucas espécies. Portanto, é importante que a espécie escolhida tenha representatividade ao menos no que diz respeito à sensibilidade frente aos contaminantes (ORGANISATION FOR ECONOMIC..., 2004). No caso de estudos desenvolvidos em laboratório relacionados a atividade estrogênica de poluentes, *Danio rerio* tem demonstrado tal característica em ensaios ecotoxicológicos (LANGE et al., 2012).

3.1.1 PAULISTINHA (*Danio rerio*)

Espécie conhecida internacionalmente como zebrafish e no Brasil também como paulistinha, é um peixe teleósteo de região tropical e de água doce, originário da Índia e do Paquistão. Tem comprimento médio de 4 cm a 5 cm (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012).

A sua popularidade no uso em estudos científicos, seja em estudos de toxicologia ou para desvendar mecanismos de algumas doenças humanas, se justifica por seu pequeno porte, fácil manutenção, baixo custo na criação, alta taxa reprodutiva, genoma sequenciado e homologia com mamíferos. Adicionalmente, o ciclo de vida de cerca de 3 anos, considerado curto, favorece estudos em diferentes períodos do desenvolvimento da espécie (ORGANISATION FOR ECONOMIC..., 2004; SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012).

Antes da fase adulta, identificar o sexo de *Danio rerio* apresenta certa dificuldade porque não há diferença sexual secundária entre os organismos. Quando adultos, a observação

da morfologia externa é suficiente para distinguir fêmeas de machos. Durante o desenvolvimento, os machos passam por um estágio de hermafroditismo. Geralmente 40 a 60 dias após eclosão, o processo de diferenciação e de maturação sexual está completo (ORGANISATION FOR ECONOMIC..., 2004; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

As fêmeas apresentam-se bem desenvolvidas, são mais volumosas e com cores mais suaves que os machos. Na região abdominal, as fêmeas tendem para o branco prateado, enquanto que os machos para o dourado (Figura 6). A linha abdominal também é útil na identificação sexual, sendo incompleta nas fêmeas e completa nos machos (ORGANISATION FOR ECONOMIC..., 2004; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008; GEORGETTI, 2010).

Figura 6 - Exemplares de *Danio rerio*. Macho, em cima com aspecto dourado, e fêmea, abaixo com tom prateado.

Fonte: Zala (2012).

3.1.2 TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)

Conhecidas mundialmente como tilápia-do-nilo, elas pertencem à família dos ciclídeos (*Cichlidae*), são de origem africana e, hoje, são encontradas em vários países do mundo. Peixe de água doce amplamente cultivado em diversas partes do mundo, classificado em três principais gêneros: *Tilapia*, *Oreochromis* e *Sarotherdon*.

Destaca-se a espécie *Oreochromis niloticus* em virtude de suas boas qualidades zootécnicas. Embora não se tenha observado diferenças morfológicas mensuráveis, no Brasil, existem duas linhagens de grande importância desta espécie: Bouaké e Chitralada. A primeira é originária da Costa do Marfim; a segunda teve origem no Egito. A Bouaké foi introduzida no Brasil, em 1971, nos açudes do Nordeste, por intermédio do Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS) e a Chitralada em 1996 (POVH et al., 2005; AYROZA, 2009).

É um organismo de corpo comprimido com escamas cicloides e linha lateral interrompida (Figura 7). O pedúnculo caudal apresenta largura e comprimento iguais. A nadadeira caudal é truncada e com diversas barras pretas. A dorsal é contínua e contém de 16 a 17 espinhos (duros) e de 11 a 15 raios (macios). Na nadadeira anal encontram-se 3 espinhos e de 10 a 11 raios. Em época de desova, as nadadeiras peitoral, dorsal e caudal tornam-se avermelhadas. Entretanto, não há como identificar o sexo da espécie apenas pela morfologia externa, pois ela não apresenta dimorfismo sexual (RAKOCY, 2005).

Figura 7 - Ilustração e foto de *Oreochromis niloticus*.

Fonte: Ilustração - Rakocy (2005). Foto – Autor (2011).

3.2 Vitelogenina

Ocorrendo normalmente em fêmeas sexualmente ativas de qualquer espécie ovípara, a vitelogenina (VTG) é uma fosfo-lipo-glicoproteína precursora do vitelo encontrado em ovo. Sua produção no fígado, por meio dos hepatócitos, é controlada pela interação de estrogênio com receptor estrogênico (RE). Machos mantêm a capacidade de produção de VTG em resposta a estímulos com agonistas de RE. Portanto, a indução de VTG em machos e fêmeas imaturas tem sido explorada como um biomarcador específico para compostos estrogênicos em diversas espécies de peixes expostos a ambientes contaminados com substâncias estrogênicas (ORGANISATION FOR ECONOMIC..., 2004; SANCHEZ, 2006).

A vitelogenina é considerada um biomarcador de exposição estrogênica em machos ou jovens, ou anti-estrogênica em fêmeas ovíparas. Como biomarcador de exposição, é usada para confirmar e avaliar a presença de xenobiontes, de seus metabólitos ou de sua interação com componentes moleculares ou celulares em compartimentos do organismo (SANCHEZ, 2006). Portanto, seu uso é importante para confirmar e avaliar a exposição de ovíparos a substâncias de ação estrogênica ou anti-estrogênica, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna.

Diversos métodos para quantificação de VTG têm sido desenvolvidos e padronizados

para uso em análises de rotina. Dentre eles, um dos mais disseminados é o Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), cujo princípio se baseia em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas (ORGANISATION FOR ECONOMIC..., 2009).

4 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

É um método imunoenzimático que usa a imunoquímica para a quantificação de VTG em pequenas amostras de sangue ou fígado coletadas de peixes. Conjuntos para medição de VTG através do método ELISA específico para espécies validadas estão atualmente disponíveis no mercado (ORGANISATION FOR ECONOMIC..., 2009). Neste ramo, a empresa Biosense Laboratories AS (Bergen, Noruega) é a mais difundida internacionalmente e apresenta um alto nível de confiabilidade entre os usuários. No Brasil, seus kits são vendidos apenas via importação, não há fabricantes, ou se há, estes não comercializam largamente seus produtos. Isto representa um fator negativo para análise ELISA de VTG, pois os preços destes conjuntos são atualmente superiores a 10 mil reais.

Embora exista uma variedade de métodos para a detecção de VTG em plasma sanguíneo, o método mais utilizado é o ELISA que, até por volta de 2005, competia a preferência com o Radioimmunoassay (RIA). Estes métodos exploram a interação altamente específica de anticorpos e o antígeno VTG para detectar a proteína em uma variedade de amostras. ELISA se sobressaiu ao alcançar sensibilidade e nível de detecção comparáveis ao RIA, sem, no entanto, requerer o uso de isótopos radioativos, além de minimizar o tempo e as etapas necessárias para uma análise robusta (ORGANISATION FOR ECONOMIC..., 2004).

Por outro lado, estes testes para detecção de VTG são considerados caros, pois consomem, ainda assim, tempo relativamente longo (ao menos 2 dias), além da necessidade de anticorpos específicos para cada espécie animal. Este fato se torna uma desvantagem quando se trabalha com peixes nativos, pois, neste caso, geralmente não existe anticorpo específico comercialmente disponível (ORGANISATION FOR ECONOMIC..., 2009).

Ainda assim, para algumas espécies é possível quantificar VTG, com base na reatividade-cruzada de anticorpos. Como exemplo, o anticorpo policlonal PO-1, que se liga a VTG de *Salvelinus alpinus*, apresenta reatividade-cruzada para detecção de VTG em diferentes espécies, dentre elas *Oreochromis niloticus*. Entretanto, neste caso o ensaio é considerado semi-quantitativo, pois é possível apenas comparar as absorbâncias das amostras com os controles, positivos e negativos, já que o nível da reatividade-cruzada varia com a espécie e com o método utilizado.

Na prática, a técnica consiste no uso de placa de poliestireno com 96 cavidades (Figura 8), denominados poços, dispostos em 12 colunas e 8 linhas. Nestes poços ocorrem as reações de interação anticorpo-antígeno, sob condições adequadas de temperatura e de meio reacional. Tais interações são detectadas mediante a reação com um substrato cromógeno,

cujo desenvolvimento de cor é medido por um espectrofotômetro dedicado à leitura destas placas. A intensidade de cor está relacionada à interação anticorpo-antígeno e, por sua vez, à concentração de VTG, no caso de kit para detecção desta proteína.

Figura 8 - Placa de poliestireno (96 poços) utilizado na análise ELISA.

Fonte: Autor (2011).

5 OBJETIVO

Avaliar a ocorrência de efeito estrogênico nos organismos-teste expostos à água do rio Itapecuru, por meio de ensaios ecotoxicológicos; com base nos resultados de quantificação de VTG, mediante o uso de ELISA, e por meio da comparação com organismos-controle.

6 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios ecotoxicológicos com *Danio rerio* foram realizados no laboratório da Estação de Tratamento de Água (ETA) do Sistema Produtor de Água, denominado ITALUIS. Já os ensaios com *Oreochromis niloticus* foram realizados à margem esquerda do rio Itapecuru e aproximadamente 615 m a jusante da captação de água deste mesmo sistema, o qual é controlado pela Companhia de Saneamento Ambiental do Maranhão (CAEMA) e está localizado à margem da rodovia BR-135, km 56, no município de Bacabeira, MA

A detecção de VTG em ambos os organismos por meio de ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) foi realizada no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática, sob coordenação do Prof. Dr. Ricardo Luvizotto Santos, Departamento de Oceanografia e Limnologia (DEOLI), no Campus do Bacanga da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

6.1 Ensaio Ecotoxicológico

Os ensaios crônicos de 21 dias foram realizados expondo-se *Danio rerio* (paulistinha) e *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-nilo) à água do rio Itapecuru. A primeira espécie de peixe foi escolhida por se tratar de um organismo-teste padronizado por normas nacionais (por exemplo, ABNT) e internacionais (OECD, por exemplo) em ensaios que investigam efeito estrogênico em organismos vivos. A segunda porque dentre as espécies comuns e de importância sócio-econômica na região de estudo, mesmo não sendo nativa, é a única para a qual existe kit ELISA comercial indicado para análise de VTG.

Os períodos dos ensaios foram de 24/03 a 13/04/2011 (período 1) e de 11/11 a 01/12/2011 (período 2), representando a época regional de chuvas e de estiagem, respectivamente.

6.1.1 PAULISTINHA (*Danio rerio*)

6.1.1.1 Seleção e preparo de organismos-teste

Exemplares de *Danio rerio* foram selecionados dentre os cultivados no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da UFMA, optando-se por peixes jovens e observando-se neles a ausência de sinais de doença (pele, morfologia externa e comportamento, por exemplo). Foram separados para aclimação por um período não inferior a 2 semanas, de modo a ser simulado o ambiente do teste crônico, incluindo o preparo da água do aquário, frequência e regime de alimentação, bem como fotoperíodo e temperatura ambiente. Decorrido este prazo,

todos foram transportados para o laboratório da ETA Italuís (Bacabeira, MA), local de realização dos ensaios crônicos, em um recipiente plástico (PEAD), contendo 18 L de água e tampado com filme plástico. Antes do início do teste crônico, os organismos foram observados durante sete dias como etapa de pré-exposição ao ambiente do laboratório e à água de diluição. Neste prazo, havendo mortalidade inferior a 5% da população testada, conforme critério definido por OECD (2009), o ensaio foi iniciado.

6.1.1.2 Realização do ensaio ecotoxicológico

Os organismos adultos foram submetidos aos ensaios em aquários de vidro (espessura 4 mm, capacidade 10 L) dispostos sobre uma bancada (Figura 9), em regime semi-estático (troca diária de 50% da água) com aeração e sob fotoperíodo natural (12 h noite e 12 h dia). Foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial para peixes ornamentais (TetraMin®, Tetra Werke).

Figura 9 - Aquários durante o ensaio ecotoxicológico com *Danio rerio* em laboratório.

Fonte: Autor (2011).

Noventa peixes foram distribuídos em 9 aquários, sendo 3 para o controle (grupo 0), 3 para exposição a concentração de 50% de água do rio (grupo 50) e outros 3 para 100% de água do rio (grupo 100). Os organismos foram divididos equitativamente entre os aquários, sendo 5 machos e 5 fêmeas em cada um. Com exceção daqueles últimos, os demais aquários tiveram o volume de 10 L completados com água de diluição (padrão). Sendo ela preparada

segundo orientações da norma brasileira ABNT NBR 15499:2007, resultando a dureza total e o pH em valores na faixa de 40 a 48 mg.L⁻¹ CaCO₃ e de 7,0 a 7,6, respectivamente. No preparo, utilizou-se água destilada; sulfato de cálcio diidratado (CaSO₄.2H₂O), cloreto de potássio (KCl); bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e sulfato de magnésio heptaidratado (MgSO₄.7H₂O), todos de grau P.A.

As variáveis pH, temperatura, oxigênio dissolvido e condutividade de cada aquário foram monitoradas diariamente, sempre antes da renovação diária de 50% da água de cada um deles.

Para estas medições foram utilizados sensor multiparamétrico (HANNA Instruments, modelo 769828) equipado com sonda HI 769828/4, sensor pH/ORP (769828-1), sensor OD (769828-2) e sensor EC (769828-3); condutivímetro (JENWAY, modelo 4520) equipado com sonda E05-027013; oxímetro portátil (HANNA Instruments, modelo 9146-04N), com sonda (76407-4F) e potenciômetro (CAAL, modelo pH BANC II). A dureza total foi determinada por titulação com EDTA, segundo método descrito por Greenberg e Eaton (2005).

Estas mesmas variáveis foram medidas na água de diluição, na água 1:1 (diluição:rio) e na água do rio. Ademais, e somente para água do rio, também se mediu cor e turbidez, em virtude de estas últimas variáveis serem de interesse no que tange à comparação da qualidade de água em períodos diferentes do ano.

6.1.2 TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)

6.1.2.1 Seleção e preparo de organismos-teste

Em cada período cerca de 30 exemplares de *Oreochromis niloticus* foram obtidos de criadouro regional (Santa Rita, MA) ainda juvenis e sem que tenham sido submetidos a qualquer tratamento hormonal que levasse a engorda ou a reversão sexual, embora esta seja uma prática comum no comércio da espécie.

O grupo controle (grupo 0), para comparação da quantidade de VTG, foi constituído de exemplares juvenis coletados em tanques (Figura 10) mantidos pelo Laboratório de Ecotoxicologia Aquática (UFMA).

Figura 10 - Tanques de criação de peixes mantidos pelo Laboratório de Ecotoxicologia Aquática (UFMA).

Fonte: Cedida pelo Prof. Ricardo Luvizotto Santos [2012?].

6.1.2.2 Realização do ensaio ecotoxicológico

No mesmo período do ensaio realizado em laboratório com *Danio rerio*, os exemplares de *O. niloticus* coletados foram introduzidos no rio Itapecuru (grupo 100) e mantidos em tanque-rede com capacidade útil de 6 m³ instalado à margem do rio (S 3°03'24,81", O 44°15'06,44"), a jusante cerca de 615 m do ponto de captação de água para abastecimento do Sistema Produtor de Água ITALUIS (Figura 11). Os organismos foram alimentados duas vezes ao dia com ração extrusada comercial para criação de peixe.

Figura 11 - Distância entre a captação da água e o ponto de instalação do tanque-rede (a). No detalhe, foto de tanque-rede durante o ensaio no período chuvoso. A linha tracejada (- - -) indica o sentido da vazão de água.

Fonte: a) Google Earth (2014); b) Autor (2011).

6.1.3 TÉRMINO DO ENSAIO CRÔNICO

Após o término dos ensaios toxicológicos, todos os organismos usados no ensaio foram anestesiados com banho em benzocaína 4% (Sigma-Aldrich) e rapidamente sacrificados seguindo recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COLÉGIO..., 1991). Cada *Danio rerio* foi pesado e agrupado quanto ao sexo e ao nível de exposição à água do rio e conservados em botijão criogênico capacidade 20 L com nitrogênio líquido (White Martins, Brasil) até o momento da análise ELISA.

Para os exemplares de *Oreochromis niloticus* coletados, os mesmos procedimentos de anestesia, de sacrifício, de agrupamento e de conservação foram empregados com os pedaços de fígado extraídos deles. O sexo de cada organismo foi confirmado observando-se a gônada.

6.2 Análise ELISA

A determinação de VTG nas amostras de peixes foi feita em dezembro de 2011 e em janeiro de 2012, de acordo com o protocolo do fabricante (Biosense Laboratories™). Utilizou-se extratos de corpo inteiro (*Danio rerio*) e de fígado (*Oreochromis niloticus*) de cada organismo submetido ao ensaio ecotoxicológico.

6.2.1 PREPARO DE EXTRATOS PARA ELISA

Conforme descrito por Rose et al. (2002) e ilustrado na Figura 12, os extratos foram preparados, sob refrigeração, macerando-se individualmente em almofariz o material (corpo inteiro e fígado) previamente pesado. O volume (em mL) da solução tampão (50 mmolL^{-1} Tris-HCl; pH 8,0; 0,02% aprotinina, $0,1 \text{ mmolL}^{-1}$ de inibidor de protease *Phenylmethanesulfon Fluoride* - PMSF) utilizado foi correspondente ao dobro da massa (em g) do material. Em seguida, centrifugou-se a $15.000g$, por 60 min, a 4°C (centrífuga Eppendorf, modelo 5415R).

Figura 12 - Etapas do preparo de extrato de *Danio rerio* para ELISA.

Fonte: Autor (2011).

A porção líquida menos viscosa (plasma) foi separada do resíduo sedimentado e armazenada sob refrigeração ($\sim 4^{\circ}\text{C}$) até o momento da análise ELISA para VTG.

6.2.2 PAULISTINHA (*Danio rerio*)

O ensaio realizado com *Danio rerio* foi do tipo quantitativo, com proteína VTG e anticorpo específicos para o organismo-teste em questão (Zebrafish vitellogenin ELISA kit; código V01008402-480; Biosense Laboratories™; Bergen, Noruega). As concentrações para construção da curva de calibração e as diluições das amostras para realização das análises tomaram por base as sugeridas pelo fabricante do kit ELISA.

As placas do kit já se encontram pré-revestidas com anticorpo específico que se liga a VTG presente nas soluções-padrão e nas amostras adicionadas aos poços. Um anticorpo de detecção é adicionado e o “sanduíche” formado de VTG e anticorpo é detectado com a adição de um anticorpo secundário marcado enzimaticamente. A atividade enzimática é determinada ao se adicionar o substrato que resulta em um produto cromógeno. A intensidade da cor é diretamente proporcional à quantidade de VTG presente no poço e, por conseguinte, na amostra. A Figura 13 representa esquematicamente o princípio descrito.

Figura 13 - Representação esquemática do princípio para ELISA tipo “sanduíche”.

Fonte: Biosense Laboratories (2005).

Os extratos foram mantidos refrigerados sob refrigeração em gelo até o preparo das diluições dos padrões e das amostras. A curva-padrão foi construída com as concentrações de padrão: 0,122; 0,246; 0,500; 0,975; 1,950; 3,917; 7,813; 16,0; 31,0; 62,5 e 125,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Estes foram preparados a partir da solubilização de VTG de *Danio rerio* purificada e liofilizada em tampão de diluição (tampão fosfato salino - PBS, pH 7,3 + albumina sérica bovina – BSA, 1%).

Os extratos de peixes machos foram diluídos 30.000 vezes e os de fêmeas, 1.800.000 vezes, em virtude da grande diferença de VTG presente entre machos e fêmeas e para que a absorbância resultante não extrapolasse a curva analítica do kit para VTG de *Danio rerio*.

Foram adicionados 100 µL de soluções-padrão e de amostras diluídas aos respectivos poços pré-revestidos. Nos poços destinados à reação não específica (branco), adicionou-se apenas tampão de diluição. Então, incubou-se à temperatura na faixa de 20 a 25 °C por 1 hora. Na Tabela 1 está apresentada a distribuição dos poços (branco, padrões e amostras) usada na realização das análises.

Tabela 1 - Distribuição do branco (B), dos padrões (P) e das amostras (A) nas placas usadas na análise ELISA para *D. rerio*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
B	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
C	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
D	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
E	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20	A21	A22	A23	A24
F	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
G	A25	A26	A27	A28	A29	A30	A31	A32	A33	A34	A35	A36
H	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

↓ = duplicata.

Em seguida lavou-se as placas 3 vezes com 300 µL de tampão de lavagem (PBS, 0,05% Tween-20) por poço, utilizando uma lavadora de placas (Thermoplate). Então se adicionou em cada poço 100 µL de solução de anticorpo de detecção e incubou-se por mais 1 hora entre 20 e 25 °C.

Após nova lavagem em triplicata das placas com 300 µL de tampão de lavagem por poço, adicionou-se 100 µL de anticorpo secundário (conjugado peroxidase da raiz-forte *Azadirachta indica* - HRP) em todos os poços. Incubou-se então por mais 1 hora, sob temperatura de 20 a 25 °C.

Na última lavagem, repetiu-se 5 vezes usando 300 µL de tampão de lavagem em cada poço por vez. Em seguida adicionou-se 100 µL de solução de substrato (o-fenilenodiamina peroxidase - OPD) a todos os poços, desta vez incubando no escuro, entre 20 e 25 °C, por 30 min.

A reação de peroxidase foi interrompida adicionando-se 50 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 96%, Panreac) 2 mol.L⁻¹ a todos os poços. Após 5 minutos, finalmente, a absorbância foi lida em leitora de placas (Thermoplate), a 492 nm.

Em cada placa, calculou-se a média das absorbâncias dos brancos. Este valor foi subtraído dos valores de absorbâncias obtidos para todos os outros poços da mesma placa,

obtendo-se a absorbância média corrigida para cada solução-padrão e para cada amostra.

A curva analítica foi construída a partir destes valores plotando-se a absorbância contra a concentração das soluções-padrão. A partir da regressão linear calculou-se a equação da reta e identificou-se a faixa linear com coeficiente de correlação linear superior a 0,990, eliminando-se os pontos inferiores e superiores testados.

A partir da equação da curva analítica, da absorbância corrigida média de cada amostra e do fator de diluição de cada extrato, calculou-se a quantidade de VTG capturada no poço. Esta foi relacionada à massa de peixe usada no preparo do extrato. Desta forma, obteve-se o valor das concentrações em micrograma de VTG por grama de peixe ($\mu\text{g VTG g}^{-1}$ peixe).

6.2.3 TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)

Para *Oreochromis niloticus*, o ensaio ELISA foi semi-quantitativo, de forma que a investigação do efeito estrogênico foi feita comparando-se as respostas (absorbâncias) dos organismos expostos à água do rio aos organismos-controle. Anticorpo policlonal (Polyclonal rabbit anti-arctic char vitellogenin, PO-1, código V01409201-500; Biosense Laboratories™; Bergen, Noruega) foi utilizado para determinação de VTG no formato de captura indireta (Biomarker ELISA component kit PAb GAR-HRP; código B00400404-480; Biosense Laboratories™; Bergen, Noruega). Para estes organismos, a diluição foi de 1.000 vezes, independente do sexo, seguindo-se a orientação do fabricante do anticorpo.

Nesta análise foi usado um kit para a detecção semi-quantitativa de VTG em amostras de peixe. A análise foi baseada na detecção de VTG usando o anticorpo policlonal PO-1 em um tipo ELISA de captura indireta (Figura 14). Como controle positivo utilizou-se a mesma VTG purificada e liofilizada usada na análise para *D. rerio*, como também exemplares fêmeas de *O. niloticus*.

Figura 14 - Representação esquemática do princípio para ELISA tipo captura indireta.

Fonte: Biosense Laboratories (2006).

Embora o anticorpo policlonal PO-1 seja específico para VTG em amostras de plasma de *Salvelinus alpinus*, ele tem reatividade-cruzada com VTG de *O. niloticus* e de *D. rerio*, entre outras, mesmo embora o nível de reatividade seja diferente de uma espécie a outra.

Os extratos foram mantidos refrigerados até o preparo das diluições das amostras e do controle positivo preparado a partir da solubilização de VTG de *Danio rerio* purificada e liofilizada em tampão de revestimento (tampão carbonato-bicarbonato 50 mmol.L⁻¹, pH 9,6).

Nos poços destinados à reação não específica (branco), adicionou-se apenas tampão de revestimento (100 µL). Nos demais poços foram adicionados 100 µL de cada extrato diluído e do controle positivo, distribuídos na placa conforme a Tabela 2. Então, incubou-se à temperatura de 4 °C durante uma noite.

Tabela 2 - Distribuição do branco (B), do controle positivo (+) e das amostras (A) nas placas usadas na análise ELISA para *O. niloticus*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	+	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
B	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
C	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20	A21	A22
D	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
E	A23	A24	A25	A26	A27	A28	A29	A30	A31	A32	A33	A34
F	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
G	A35	A36	A37	A38	A39	A40	A41	A42	A43	A44	A45	A46
H	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

↓ = duplicata.

No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com 300 µL de tampão de lavagem (PBS, 0,05% Tween-20) por poço, utilizando uma lavadora de placas (Thermoplate). Então se adicionou em cada poço 200 µL de tampão de diluição/bloqueio (tampão fosfato salino - PBS, pH 7,3 + albumina sérica bovina – BSA, 1%) a todos os poços e incubou-se por 1 hora, à temperatura de 20 a 25 °C.

Em seguida esvaziou-se a placa, se adicionou 100 µL de solução de anticorpo primário (policlonal PO1) a todos os poços e se incubou a 37 °C, por 1 hora. Prosseguiu-se à lavagem em triplicata das placas com 300 µL de tampão de lavagem por poço e à adição de 100 µL de anticorpo secundário (conjugado peroxidase da raiz-forte *Armoracia rusticana* - HRP) em todos os poços. Incubou-se então por mais 1 hora, à temperatura de 20 a 25 °C.

A última lavagem foi repetida 5 vezes usando 300 µL de tampão de lavagem em cada poço por vez. Em seguida adicionou-se 100 µL de solução de substrato (o-fenilenodiamina peroxidase - OPD) a todos os poços, incubando-se no escuro, entre 20 e 25 °C, por 15 min.

A reação de peroxidase foi interrompida adicionando-se 50 µL de ácido sulfúrico

(H₂SO₄ 96%, Panreac) 2 mol.L⁻¹ a todos os poços. Finalizando, a absorbância foi lida em leitora de placas (Thermoplate), a 492 nm.

Em cada placa, calculou-se a média das absorbâncias dos brancos. Este valor foi subtraído dos valores de absorbâncias obtidos para todos os outros poços da mesma placa, obtendo-se a absorbância média corrigida para cada amostra e controle positivo.

Por se tratar de um método semi-quantitativo não há curva analítica para ser construída. Apenas é possível se comparar as absorbâncias obtidas para cada amostra e controle positivo.

6.2.4 ANÁLISE DOS DADOS

Os valores das análises ELISA foram testados quanto à normalidade e à homocedasticidade, usando-se os testes de Shapiro-Wilk e de Levene, respectivamente. Verificando-se a normalidade e a homocedasticidade, realizou-se teste de Grubbs para identificação de outliers e então se comparou os grupos através do teste de ANOVA para amostras independentes. Caso contrário, executou-se a comparação por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (ZAR, 1984; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). A Tabela 3 demonstra as etapas da análise estatística dos dados ecotoxicológicos.

Tabela 3 - Etapas na análise estatística dos dados dos ensaios ecotoxicológicos.

Normalidade (Shapiro-Wilk)	Homocedasticidade (Levene)	Outlier	Comparação dos grupos
Sim	Sim	Grubbs	ANOVA
Sim	Não	-	Kruskal-Wallis
Não	Sim	-	
Não	Não	-	

Para realização dos cálculos e construção dos gráficos foram utilizados os programas de computador Statistica 7.0 (StatSoft. Inc., EUA), Office Excel[®] 2007 (Microsoft, EUA) e o suplemento Action[®] (versão 2.5.197.344, Estatcamp, Brasil) para Excel.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho foi desenvolvido em dois períodos do ano, distintos com relação à condição climática da área de estudo. Portanto, aqui se convencionou que o período referente a ocorrência de chuvas trata-se do período 1 (março, abril de 2011), ficando o período de estiagem (ou seca) denominado período 2 (novembro de 2011).

7.1 Ensaio Ecotoxicológico

Durante os 21 dias de ensaio, a temperatura da água de cada aquário teve amplitude máxima variando de 5 a 6,5 °C, estando estas entre 21 e 28 °C, no período 1; e amplitude máxima de 4 a 5,5 °C, na faixa de 22 a 27 °C, no período 2. Entre cada aquário, a diferença das temperaturas dia a dia, não superou $\pm 1,5$ °C.

Em ambos os períodos, as variáveis oxigênio dissolvido (OD) e pH estiveram dentro da faixa considerada adequada (superior a 4,0 mg.L⁻¹ e de 5,0 a 9,0, respectivamente) de modo a evitar interferência no resultado dos ensaios (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA..., 2007).

Entre o período 1 (março, abril de 2011) e o 2 (novembro de 2011), nota-se a diferença entre os valores das variáveis pH, cor e turbidez da água do rio (Figura 15). Essa característica é notória principalmente em função da variação pluviométrica da região (ANEXO A), pois no período 1 há frequente ocorrência de chuvas, fato que não ocorre no período 2.

Figura 15 - Comparação das variáveis cor, turbidez e pH da água do rio Itapecuru entre os períodos 1 e 2.

No período 1, as chuvas acarretaram arraste de material (partículas de solo, matéria orgânica,...) às margens do rio, incluindo contaminantes, para o curso deste. Como

consequência, geralmente nos casos de margens poluídas e/ou desmatadas, os valores de cor e turbidez aumentam e os de pH diminuem.

Em relação à água do rio, observou-se aumento de pH e diminuição dos valores de OD e de condutividade quando se compara do período 1 para o 2 (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores médios de pH, OD e condutividade da água do rio Itapecuru medidos durante os ensaios.

	período 1	período 2	diferença (2-1)	% diferença*
pH	6,46	6,57	0,12	1,83
Oxigênio dissolvido	5,05	3,96	-1,09	-21,58
Condutividade	85,53	61,27	-24,26	-28,36

* Diferença calculada em relação à média do período 1. Sinal negativo indica redução do período 1 para o 2, e o positivo, aumento.

Na medição de condutividade, observou-se diferença de até 180 unidades no período 1 em um mesmo dia ao se comparar a água do rio com a água de diluição preparada de acordo com ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA..., 2007). No período 2, essa diferença chegou a 110 unidades. A média desta propriedade da água do rio no período 1 foi de $85,5 \mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$ e no período 2, de $61,27 \mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$. Faixa de valores considerados pequenos e que indicam baixa quantidade de minerais eletrólitos dissolvidos na água do rio, bem como a influência das chuvas no aporte de materiais para o leito do rio Itapecuru.

7.2 Paulistinha (*Danio rerio*)

A massa média dos organismos ($n=92$) utilizados no ensaio ecotoxicológico foi de 0,32 g com desvio-padrão de 0,07. A pequena massa de alguns exemplares, notadamente machos, impossibilitou a análise de VTG exclusivamente para cada organismo, sendo necessário em alguns casos o agrupamento de 2 deles quando no preparo dos extratos. Os grupos foram formados considerando o nível de exposição (0, 50 ou 100%) à água do rio e o sexo de cada organismo. Tal procedimento foi importante para garantir o volume mínimo de 100 μL de extrato necessário para a análise ELISA.

Os dados para análise estatística foram calculados em micrograma de VTG por grama de peixe ($\mu\text{g VTG g}^{-1}$ peixe), relacionando as concentrações ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) de VTG encontradas nos extratos, para utilização em ELISA, com a massa (g) de peixe usada no preparo dos 100 μL destes. Tais concentrações foram calculadas mediante as curvas analíticas construídas para cada placa ELISA usada na análise. Valores negativos de absorbância foram considerados iguais a zero para efeito de cálculos, pois não há sentido biológico para concentração negativa

de VTG. Na Figura 16 encontram-se as curvas analíticas utilizadas para a quantificação de VTG nas amostras.

Figura 16 - Curvas analíticas (absorbância x concentração em $\mu\text{g.L}^{-1}$) para o cálculo de concentração de VTG em *Danio rerio*. As barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha = 0,05$) em cada ponto da curva.

Curvas analíticas foram obtidas para cada placa usada na determinação de VTG, conforme orientação do fabricante (BIOSENSE..., 2005) dos kits ELISA. Encontrou-se resposta linear na faixa de $0,246 \mu\text{g.L}^{-1}$ a $31,0 \mu\text{g.L}^{-1}$, sendo esta a faixa na qual se calculou as concentrações de VTG nos extratos.

Os testes estatísticos mostraram normalidade ($p \geq 0,05$) apenas para machos do grupo 50, no período 2, e para fêmeas do grupo 100, no período 1. A homocedasticidade ($p \geq 0,05$) dos dados foi identificada em parte dos grupos. Para se usar análise estatística paramétrica, é necessário que os dados sejam normais e homogêneos. Neste caso, esta condição não foi atendida. Portanto, as médias dos grupos foram comparadas por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Os dados encontram-se nos APÊNDICES 1 e 2.

Na Figura 17 é possível observar que no período das chuvas (período 1) foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) apenas entre os exemplares machos do grupo 100 e do grupo 0 (controle). Os resultados indicam que na água do rio há ocorrência de substâncias causadoras de efeito estrogênico em quantidade suficiente para promover alterações bioquímicas associadas à reprodução em machos da espécie, ou seja, houve estimulação na produção de VTG. Ainda assim, ao se verificar as concentrações de VTG neste mesmo período, nota-se que estas são significativamente menores em machos em relação às fêmeas (Figura 17). Esta última observação está de acordo com a situação esperada e demonstra que mesmo os machos apresentando alteração nas concentrações de VTG, esta não foi tão intensa a ponto de feminizar os organismos machos.

No período de estiagem (período 2), a Figura 17 mostra que ocorreu diferença significativa ($p < 0,05$) apenas entre os exemplares fêmeas do grupo 100 e do grupo 0 (controle). Entretanto, contrariamente ao caso mencionado anteriormente com os organismos machos no período 1, os resultados sugerem efeito inibidor da produção de VTG por fêmeas da espécie. Este é também um efeito associado a desreguladores endócrinos, embora não seja um efeito estrogênico. Neste caso, a redução do nível de VTG em fêmeas pode ser associada, por exemplo, a substâncias químicas que inibem a aromatase, que é uma reação de conversão de andrógeno no estrógeno natural 17β -estradiol (E2). Por conseguinte, a redução do nível de E2 tem como efeito a redução dos níveis de VTG nos organismos (ORGANISATION FOR ECONOMIC..., 2009).

Figura 17 - Box-plot, organizado por período e sexo, das concentrações ($\mu\text{g VTG g}^{-1}$ peixe) de VTG encontradas em exemplares de *Danio rerio* submetidos a ensaio crônico de 21 dias.

Legenda: Cada grupo codificado como se segue. M = macho; F = fêmea; C = chuva; E = estiagem; 0 = grupo 0 (controle); 50 = grupo 50; 100 = grupo 100.

É possível se explicar tal observação tendo em vista que o ensaio ecotoxicológico realizado (tópico 6.1.1.2) considerou, como amostra-teste, alíquotas de água do rio Itapecuru, cuja constituição apresenta variações em conformidade com o seu regime fluvial

(MINISTÉRIO DO MEIO..., 2006a). Assim, é de conhecimento comum que em época de chuvas ocorre lixiviação de materiais e substâncias para o corpo do rio, como também ocorre aumento do seu volume e de sua vazão. Deve-se também levar em conta neste período o incremento na quantidade de fontes difusas de poluição, que geralmente não ocorrem sem as chuvas.

Por outro lado, no período de estiagem, as fontes pontuais de poluição se sobressaem às fontes difusas e se tornam de grande importância no aporte de contaminantes orgânicos para o rio. Também a vazão e o volume de água do rio se tornam menores (MINISTÉRIO DO MEIO..., 2006a).

Portanto, estes cenários configuram características diferentes para a amostra-teste em virtude da variação sazonal da região. Deste modo, as substâncias com efeitos mais pronunciados nos organismos-teste machos podem se apresentar em maior concentração, ou se mais biodisponíveis, no período das chuvas. Por outro lado, estes poluentes podem estar em concentrações muito menores no período de estiagem, possibilitando assim a observação dos efeitos de outros poluentes em fêmeas.

7.3 Tilápia (*Oreochromis niloticus*)

Esta espécie tem porte bem maior que *Danio rerio*. Os exemplares (n=65) usados no ensaio ecotoxicológico apresentaram massa média igual a 104 g, com desvio-padrão de 21. Tendo em vista a grande massa dos exemplares de *Oreochromis niloticus* e que a vitelogenina é produzida no fígado de animais ovíparos, tal como peixes, optou-se por medir indiretamente esta proteína através das absorbâncias relativas obtidas a partir dos extratos de amostras de fígado (tópico 6.2.3). Durante a coleta, observou-se o cuidado de não incluir tecidos de órgãos vizinhos ao tecido hepático (Figura 18-c).

Em virtude de não haver dimorfismo sexual, cada exemplar de *O. niloticus* teve seu sexo confirmado no momento da dissecação (MAKINO et al., 2009) para retirada do fígado, através da observação da gônada (Figura 18). Quando se tratava de ovário, facilmente notava-se a presença de ovócitos e uma gônada volumosa. Do contrário, quando se tratava de testículo, a gônada se apresentava como filetes e sem a presença de ovócitos.

Figura 18 - *O. niloticus* com incisão para dissecação (a = testículo; b = ovário; c = fígado).

Fonte: Autor (2011).

Para a identificação de alteração no nível de VTG nos organismos-teste, foi realizada análise ELISA do tipo semi-quantitativo. Por esta razão, não há curva analítica para se quantificar VTG, de modo que a avaliação da ocorrência de efeito estrogênico foi feita por comparação qualitativa entre o grupo exposto à amostra-teste água do rio Itapecuru (grupo 100) e o grupo controle (grupo 0). Portanto, as respostas diretas do leitor de placas ELISA, em unidades de absorbância a 492 nm, foram os dados comparados entre os grupos (Figura 19).

Figura 19 - Box-plot, organizado por período e sexo, das absorbâncias (492 nm) de VTG encontradas em exemplares de *Oreochromis niloticus* submetidos a ensaio crônico de 21 dias.

Legenda: Cada grupo codificado como se segue. M = macho; F = fêmea; C = chuva; E = estiagem; 0 = grupo 0 (controle); 50 = grupo 50; 100 = grupo 100.

Ao contrário dos dados para *Danio rerio*, a normalidade e a homocedasticidade (APÊNDICE 3) foram identificadas e, portanto, as absorbâncias do ensaio ELISA foram comparadas através do teste de ANOVA, com significância de 95% ($p < 0,05$). Observou-se aumento significativo na quantidade de VTG somente em machos no período 2 (estiagem), indicando efeito estrogênico em machos neste período, tal qual ocorrido no período 1 (chuvas) com *Danio rerio*. O referido aumento não elevou a concentração de VTG aos valores encontrados ($p < 0,05$) para as fêmeas do grupo 0 (controle), em ambos os períodos.

Tal diferença nos efeitos encontrados entre os organismos-teste pode ser creditada às características divergentes e intrínsecas das espécies de peixes. Enquanto *Danio rerio* é conhecidamente um organismo mais sensível e que necessita de determinadas condições para a sobrevivência e reprodução, *Oreochromis niloticus* é robusto e resistente, chegando a sobreviver em locais bastante impactados, onde grande parte de espécies definham.

Lu et al. (2010) relatou trabalho similar ao aqui apresentado desenvolvido no rio Yangtze (China), usando *Carassius auratus* como organismo-teste. Concluiu que os efeitos encontrados estão principalmente relacionados à presença de E2 na água do rio, cuja origem principal é o lançamento de esgotos sanitários e industriais naquela região de estudo.

8 CONCLUSÃO

A indução de VTG em machos ocorreu em ambas espécies, embora em períodos distintos. Já a supressão foi observada somente para fêmeas de *D. rerio*. Os resultados, portanto, sugerem que a água do rio Itapecuru contém substâncias em quantidade suficiente para causar alterações endócrinas no sistema sexual reprodutivo de *Danio rerio* e de *Oreochromis niloticus*.

As variáveis físico-químicas avaliadas apontam a variação da qualidade da água do rio Itapecuru, de acordo com o seu regime fluvial, que apresenta abundância de águas, de fevereiro a maio, e de escassez, de agosto a novembro.

Esta variação, em termos de abundância de águas, contribui no entendimento das diferenças observadas em relação aos efeitos estrogênicos causados pela água do rio nas espécies estudadas. A associação destes efeitos ao regime fluvial tropical e ao fato de que todos os municípios da bacia do Rio Itapecuru carecem de saneamento eficiente, sugere que há consideráveis mudanças, ao longo do ano, no número e na concentração de substâncias poluentes presentes no rio.

CAPÍTULO II

Tendo em vista os resultados e a conclusão do estudo descrito no Capítulo I, foi feita investigação, por meio de análise química instrumental, da ocorrência na água do rio Itapecuru de poluentes relacionados ao efeito estrogênico. Gutendorf e Westendorf (2001) apontaram o estrogênio sintético 17 α -etinilestradiol (EE2) e o natural 17 β -estradiol (E2), como as substâncias contaminantes do meio ambiente de maior estrogenicidade. Ou seja, dentre todos os poluentes capazes de causar efeito estrogênico em organismos vivos, estes dois hormônios são os que apresentam maior potencial em produzir efeito agonista em relação à produção de vitelogenina.

Portanto, o hormônio natural 17 β -estradiol (E2) e o sintético 17 α -etinilestradiol (EE2) foram as substâncias selecionadas para serem quantificadas por meio de análise cromatográfica. Além de terem sido encontradas em corpos d'água contaminados por esgoto sanitário em diferentes regiões do Brasil e do mundo, elas conhecidamente apresentam potencial estrogênico mais elevado que substâncias comumente investigadas com relação a efeito estrogênico em organismos vivos (VAN DEN BELT; VERHEYEN; WITTERS, 2003; BILA; DEZOTTI, 2007).

1 HORMÔNIOS ESTRÓGENOS

Hormônios são substâncias que derivam de diversas classes de moléculas biológicas, podendo ser uma proteína, um esteróide, um aminoácido ou um ácido graxo. São mensageiros químicos que, através da corrente sanguínea, veiculam informação entre diferentes tipos de tecidos e células, os quais identificam os hormônios através de receptores específicos, localizados no núcleo das células, que são especializados no reconhecimento molecular. A partir desta interação hormônio-receptor é que ocorrem as respostas biológicas específicas (GREENSPAN; GARDNER, 2004; REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006; NOGUEIRA, 2003).

No caso dos esteróides (ou esteróides sexuais), estes são produzidos a partir do colesterol (Figura 18) e podem ser classificados em três grupos principais: hormônios sexuais femininos (ou estrógenos); hormônios sexuais masculinos (ou andrógenos) e hormônios da gravidez (ou progestógenos) (GREENSPAN; GARDNER, 2004; REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006; NOGUEIRA, 2003).

O estrógeno sintético 17 α -etinilestradiol (EE2), amplamente usado na medicina em terapias de reposição e métodos contraceptivos, e o natural 17 β -estradiol (E2) são considerados os responsáveis pela maioria dos efeitos desreguladores, desencadeados pela disposição inadequada de efluentes, pois estes hormônios possuem a melhor conformação reconhecida pelos receptores. A Figura 18 mostra a estrutura química das substâncias estudadas, e a Tabela 5 apresenta algumas de suas características. $\beta\alpha$

Figura 20 - Estrutura molecular dos hormônios estrógenos analisados e do colesterol.

Tabela 5 - Principais características dos estrógenos.

Substância	Fórmula molecular ^a	Massa molar (g mol ⁻¹) ^b	γ_{sat} (mg.L ⁻¹ , a 25 °C) ^a	log K _{ow}	Pressão de vapor (mm Hg) ^a	K _{oc} ^a	pK _a ^c
17 β -estradiol	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272,4	12,96	3,94 ^b - 4,01 ^a	2,3 x 10 ⁻¹⁰	3300	10,46
17 α -etinilestradiol	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296,4	4,83	3,67 ^a - 4,15 ^b	4,5 x 10 ⁻¹¹	4770	10,40

γ_{sat} : solubilidade em água; K_{ow}: coeficiente de partição octanol-água;

K_{oc}: constante de sorção em carbono orgânico.

Fonte: ^a Reis Filho; Araújo e Vieira (2006), ^b Ying; Kookana e Ru (2002) e ^c Hurwitz; Liu (1977).

1.1 Características Físicas e Químicas

Observando-se a Tabela 5, percebe-se que o estrógeno sintético EE2 tem solubilidade em água cerca de três vezes menor que o estrógeno natural E2, enquanto apresentam valores de partição octanol-água (log K_{ow}) similares, bem como baixos valores de pressão de vapor. De modo geral, nota-se que as substâncias estudadas são hidrofóbicas e de baixa volatilidade, indicando tendência à sorção em solo e sedimentos, o que pode significar baixa concentração de estrógenos na fase aquosa, conforme afirma Ying; Kookana e Ru (2002).

Entretanto, conforme citação de Reis Filho; Araújo e Vieira (2006), estudos realizados por Bowman; Readman e Zhou (2003) afirmam que, embora as partículas influenciem no comportamento ambiental dos estrógenos, a sorção é relativamente limitada, permanecendo primariamente em associação com a fase aquosa. Holthaus et al. (2002) apud Lopes (2007) corroboram com esta assertiva, ao afirmar que sedimentos suspensos são responsáveis pela remoção de quantidade menor que 1% dos estrogênios presentes na coluna d'água. A adsorção ocorre preferencialmente nas primeiras 24 horas de contato, sendo maior para os hormônios com maior coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) e para as partículas de

menor tamanho.

Contrariamente, Lai et al (2000) afirmam que os estrógenos podem rapidamente adsorverem-se na superfície dos sólidos em suspensão, indicando a competição com outras substâncias mais hidrofóbicas por sítios de ligação. A respectiva saturação destes sítios e a quantidade de carbono orgânico total (COT) presente na água, além da salinidade desta, são fatores responsáveis pela proporção de estrógenos que permanecem na fase aquosa.

Segundo D'Agostinho e Flues (2006), K_{oc} é o coeficiente de partição do contaminante na fração orgânica do solo, ou seja, competição entre solo-água corrigido pela matéria orgânica do solo. Portanto, pode-se esperar preferência dos estrógenos por sedimentos ricos em carbono orgânico e que EE2 apresenta maior afinidade a carbono orgânico que E2.

Contudo, Lai et al. (2000) observa que, em comparação ao observado experimentalmente em laboratório, em sistemas naturais uma proporção maior de estrógenos, particularmente os naturais, permanece na fase aquosa.

De maneira geral, observa-se que E2 e EE2, em maior ou menor concentração, vêm sendo encontrados dispersos no meio aquoso dos mananciais. Algumas situações específicas podem favorecer a associação destes compostos aos sedimentos, no entanto estes hormônios costumam ser estudados e detectados solubilizados em água natural superficial, ou seja, não associados a sedimentos ou partículas em suspensão.

1.2 Métodos de Análise

Quando a comunidade científica percebeu que estrógenos no ambiente podem acarretar perturbação endócrina incorrendo em efeitos estrogênicos em diversas espécies expostas, vários métodos de determinação destas substâncias, em matrizes diversas passaram a ser desenvolvidos.

Não são poucos os artigos de revisão publicados em periódicos especializados. Alguns tratam de métodos com fundamentos e técnicas enfatizadas nas ciências biológicas enquanto outros, na química. Às vezes tratam de desreguladores endócrinos de um modo geral, outras de algum grupo específico, seja em função da classe química estrutural (organoclorados, hidrocarbonetos poliaromáticos, esteroides e outros), seja da finalidade de seu uso (fármacos, pesticidas, conservantes, entre outros).

Uma das revisões mais recentes, relacionada a este tema, trata especificamente sobre métodos químicos analíticos de determinação de hormônios estrógenos (esteroides). Nele, Tomšíková et al. (2012) comparam revisões, publicadas de 2004 a 2011, sobre determinação de baixas concentrações de hormônios sexuais femininos no ambiente, com atenção especial a

procedimentos analíticos que podem melhorar a detectabilidade do método. Portanto, discutem-se as condições cromatográficas e de detecção, o preparo de amostras e a influência de cada fator na eficiência de separação, de seletividade e de detectabilidade.

Os autores concluem que o preparo de amostra é uma das etapas mais importantes e mais demoradas do método analítico e que amostras de água têm sido mais frequentemente analisadas usando-se SPE off-line. Relatam que HPLC e GC têm sido as principais técnicas empregadas na determinação de estrógenos, acoplados aos detectores UV, FLD, MS e MS², em ordem crescente de detectabilidade. Informações estas corroboradas por Silva e Collins (2011). Finalmente, Tomšíková et al. (2012) afirmam que LC-MS² é uma das técnicas disponíveis mais convenientes na determinação de hormônios.

Entretanto esta é uma técnica de custo elevado e nem sempre disponível em universidades brasileiras. E, portanto, costuma-se desenvolver e utilizar métodos que empregam detectores UV e FLD.

1.3 Fluorescência e Detecção de Estrógenos

Conhecendo-se a estrutura molecular de E2 e EE2 e o mecanismo da fluorescência é possível entender porque esta técnica de detecção produz bons resultados frente à análise quantitativa destes estrógenos.

Para se detectar a fluorescência de uma molécula é preciso excitar a amostra no seu comprimento de onda (λ) de absorção, também conhecido como de excitação, e então medir a emissão a um λ denominado de fluorescência, ou de emissão. Uma vez excitada, processos que causam a perda do excesso de energia da molécula podem ocorrer por meio de mecanismos diferentes, sendo a relaxação não radiativa e a emissão fluorescente os mais importantes dentre eles (SKOOG et al., 2006).

Existem dois métodos de relaxação não radiativa que competem com a fluorescência. A relaxação vibracional ocorre durante as colisões entre as moléculas excitadas e as moléculas do solvente. A relaxação denominada conversão interna ocorre entre os níveis vibracionais mais baixos de um estado eletrônico e os níveis vibracionais mais altos de outro estado eletrônico. Sabe-se que a conversão interna é muito menos eficiente do que a relaxação vibracional, contudo os mecanismos de ambos os processos de relaxação ainda não foram elucidados (SKOOG et al., 2006).

A fluorescência é um dos muitos mecanismos pelos quais a molécula retorna ao seu estado fundamental original após ter sido excitada pela absorção de radiação. Todas as

moléculas absorventes apresentam potencial para fluoescerem, contudo, muitos compostos não o fazem porque suas estruturas favorecem que a relaxação não radiativa ocorra mais rapidamente que a emissão fluorescente.

Certas moléculas carbonílicas alicíclicas e alifáticas, bem como as estruturas de ligações duplas altamente conjugadas, emitem radiação fluorescente, contudo substâncias com anéis aromáticos em sua estrutura apresentam emissão mais intensa e melhor aproveitável.

A intensidade de fluoescência de hidrocarbonetos aromáticos não substituídos aumenta com o número de anéis e com o grau de condensação. A rigidez na estrutura molecular favorece a fluoescência, pois diminui a velocidade da relaxação não radiativa ao ponto em que a relaxação por fluoescência tenha tempo de ocorrer. Por outro lado, o aumento da temperatura e a diminuição da viscosidade interferem negativamente na intensidade de fluoescência, porque levam à maior probabilidade de relaxação colisional, que também não é radiativa.

A fluoescência é linearmente crescente com o aumento da concentração do analito, contudo, a concentrações muito altas, atinge um máximo e pode mesmo começar a decrescer com o aumento da concentração. Ressalta-se que os métodos baseados em fluoescência tem detectabilidade maior que os de absorção, na ordem de uma a três magnitudes de grandeza. Por outro lado, moléculas com pequenas diferenças estruturais frequentemente apresentam espectros de fluoescência similares.

Em sistemas para detecção de fluoescência, a emissão é geralmente medida em ângulo reto em relação ao feixe incidente (excitação) para evitar a interferência desse feixe. Neles, as fontes costumam ser mais potentes que as utilizadas em equipamentos para medição da absorção (ultravioleta ou visível).

Na Figura 19 é apresentado um diagrama esquemático do detector de fluoescência (G1321A, Agilent 1200 series) usado neste trabalho. São utilizados dois seletores de comprimento de onda (monocromador) para selecionar λ de excitação e de emissão. O fotodiodo de referência, localizado atrás da célula de fluxo, monitora a radiação e usa os dados para compensar o ruído nas medições da fluoescência. O tubo fotomultiplicador detecta a intensidade da radiação emitida originada na célula de fluxo e a converte em resposta analítica, conforme as configurações de operação (AGILENT TECHNOLOGIES, 2006).

Figura 21 - Diagrama esquemático do detector de fluorescência Agilent 1200 series, modelo G1321A.

Fonte: Autor (2014).

2 OBJETIVO

Desenvolver e validar método cromatográfico para determinação de 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol em amostras de água superficial natural.

Verificar a ocorrência e quantificar os hormônios 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol em amostras de água do rio Itapecuru, usando para tanto um cromatógrafo a líquido acoplado a detector de fluorescência e, como preparo de amostra, a extração em fase sólida.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As amostras coletadas no rio Itapecuru foram preparadas para análise química instrumental no Núcleo de Análise de Resíduos de Pesticidas, sob coordenação da Profa. Dra. Gilvanda Silva Nunes, Departamento de Tecnologia Química, no mesmo campus da UFMA. Elas foram encaminhadas para análises cromatográficas no Grupo de Química Analítica Aplicada a Medicamentos e a Ecossistemas Aquáticos e Terrestres, sob coordenação da Profa. Dra. Eny Maria Vieira, Instituto de Química de São Carlos (IQSC), Campus 1 da Universidade de São Paulo (USP).

No preparo de soluções para o desenvolvimento e validação do método foram usados padrões analíticos (17α -etinilestradiol e 17β -estradiol) com pureza mínima de 97% (Sigma-Aldrich). Soluções-estoque destes analitos foram preparadas em acetonitrila (ACN, grau HPLC - J.T.Baker) à concentração de 125 mg.L^{-1} e armazenadas sob refrigeração ($\approx 4^\circ \text{C}$) por não mais que 6 meses. Após esse prazo, nova solução-estoque era preparada.

As soluções de trabalho foram preparadas a partir da solução-estoque em diferentes concentrações, diluindo-se em metanol (MeOH, grau HPLC - Merck).

3.1 Preparo de Amostra

A matriz das amostras de estudo deste trabalho consiste de água superficial natural de rio. Observando que vários rios têm seus leitos poluídos, é necessário atentar-se à possibilidade de a amostra coletada conter alta carga microbiológica capaz de continuamente degradar biologicamente alguns dos analitos de interesse, inclusive após a coleta. Neste sentido, Lai et al. (2000) relatam que estrógenos naturais dissolvidos em ambiente fluvial degradam-se relativamente rápido, como no caso do E2 que tem meia-vida de apenas 4 dias.

Também, em virtude da natureza da amostra, quantidade considerável de material particulado e em suspensão estará presente no material coletado. Portanto, acidificação e filtração da amostra, e isolamento e concentração dos analitos foram as etapas necessárias para a preservação e o preparo das amostras previamente à análise cromatográfica.

Testou-se a acidificação da amostra usando-se ácido sulfúrico 96% (H_2SO_4 , Panreac) ou ácido clorídrico P.A 36,5%-38% (HCl, J.T.Baker), adicionado-os imediatamente após a coleta da amostra, em quantidade suficiente para levar a $\text{pH } 2,00 \pm 0,2$, conforme descrito por Greenbarg e Eaton (2005). Tal procedimento demonstrou ser importante no sentido de preservar substâncias orgânicas presentes na amostra, evitando degradação biológica e abiótica (hidrólise, por exemplo) dos analitos de interesse (VANDERFORD et al., 2003;

VEGA-MORALES; SOSA-FERRERA e SANTANA-RODRÍGUEZ, 2010). Adicionalmente, tendo em vista o pK_a dos hormônios estudados, a acidificação inibe a desprotonação dos compostos, o que, por sua vez, os torna mais estável na amostra.

A filtração tem fundamental importância no sentido de se evitar o entupimento dos cartuchos de extração em fase sólida (SPE), como também danos ao sistema cromatográfico. Contudo, foi de suma importância escolher uma membrana filtrante que não fosse capaz de adsorver ou simplesmente reter as moléculas dos analitos de interesse presentes na amostra. Para tanto, foram testadas diferentes opções de membranas sendo elas em fibra de vidro (FV - diâmetro 47 mm, poro 0,7 μm ; Sartorius); em celulose regenerada (RC - diâmetro 47 mm, poro 0,45 μm ; Sartorius); em nylon (NY - diâmetro 47 mm, poro 0,45 μm ; Millipore); e em acetato de celulose (CA - diâmetro 47 mm, poro 0,45 μm ; Sartorius).

A concentração e isolamento dos analitos foram realizados por meio da extração em fase sólida (SPE). Embora preenchidos com fase adsorvente similar (octadecilsilano - C18), foram testados cartuchos Agilent (SampliQ C18 500 mg/6 mL) e Phenomenex (Strata C18-E 500 mg/3 mL). Em experimentos realizados no Grupo de Química Analítica Aplicada a Medicamentos e a Ecossistemas Aquáticos e Terrestres observou-se que o uso de diferentes marcas de cartucho de SPE é capaz de gerar resultados significativamente diferentes.

O princípio da técnica envolve a partição dos compostos de interesse entre um líquido (eluente) e uma fase sólida (sorvente ou adsorvente), permitindo por sorção a concentração e o isolamento de analitos da solução. A técnica consiste de 4 etapas sucessivas: condicionamento do adsorvente; percolação da amostra; lavagem da fase sólida (opcional) e eluição (CAMEL, 2003). A terceira etapa, embora seja opcional, é importante no sentido de remover do cartucho substâncias que possam interferir na análise cromatográfica e dificultar a resolução, identificação e quantificação dos analitos.

As condições usadas neste trabalho para SPE tomaram por base as relatadas por Verbinnen; Nunes e Vieira (2010) e Vega-Morales; Sosa-Ferrera e Santana-Rodríguez (2010). Na Tabela 6 são apresentadas características dos procedimentos usados por estes autores.

Tabela 6 - Procedimentos SPE que serviram de base para o trabalho.

Etapas SPE	Verbinnen; Nunes e Vieira (2010)	Vega-Morales; Sosa-Ferrera e Santana-Rodríguez (2010)
Condicionamento	9 mL MeOH + 9 mL H ₂ O (3 mL.min ⁻¹)	3 x 5 mL MeOH + 3 x 5 mL H ₂ O (5 mL.min ⁻¹)
Percolação da amostra	400 mL (2 mL.min ⁻¹)	250 mL (10 mL.min ⁻¹)
Lavagem do adsorvente	10 mL MeOH:H ₂ O (1:9) + secagem sob vácuo	2 x 5 mL H ₂ O + secagem sob vácuo por 10 min
Eluição	2 x 2 mL ACT (1 mL.min ⁻¹) + secagem do extrato com N ₂	2 mL MeOH (1 mL.min ⁻¹) + secagem do extrato com N ₂
Reconstituição	500 μL MeOH	100 μL MeOH

ACT = acetona (grau HPLC - J.T.Baker)

MeOH = metanol (grau HPLC - Merck)

N₂ = gás nitrogênio (pureza 99,999% - White Martins)

Em busca de baixos valores para a faixa de trabalho do método, ou seja, na ordem de unidades de ng.L⁻¹, fatores importantes no preparo de amostras foram estudados, seja mudando o solvente orgânico e o seu volume, o material adsorvente e da membrana filtrante ou alguma etapa do procedimento (Tabela 7). O percentual de exatidão, a precisão e o fator de concentração (Fc) foram as respostas para comparação dos resultados.

Tabela 7 - Fatores estudados no preparo de amostras: acidificação, filtração e SPE.

Fator	Alternativas
Ácido para acidificação da amostra	HCl; H ₂ SO ₄
Tipo de membrana filtrante	fibra de vidro (FV), celulose regenerada (RC), acetato de celulose (AC), nylon (NY)
Tipo de adsorvente	SampliQ C18 (Agilent); Strata C18 (Phenomenex)
Lavagem do adsorvente	com H ₂ O; sem lavagem
Solvente de eluição	MeOH; ACN
Solvente de condicionamento	MeOH; ACN
Volume de solvente de reconstituição	400 µL e 100 µL

3.2 Sistema Cromatográfico

De Verbinnen; Nunes e Vieira (2010) foram obtidas as condições iniciais de desenvolvimento do método cromatográfico de análise para 17β-estradiol (E2) e 17α-etinilestradiol (EE2). Vega-Morales; Sosa-Ferrera e Santana-Rodríguez (2010) e Ye et al. (2013) forneceram informações importantes para adaptações, principalmente para o preparo de amostras, pois a matriz do presente trabalho é mais similar à matriz estudada pelos referidos autores.

O sistema cromatográfico usou um cromatógrafo a líquido (1200 series, Agilent) equipado com degaseificador; bomba quaternária de alta pressão, tipo pistão; injetor automático; termostato para controle de temperatura da fase móvel na coluna; e microcomputador, com programa ChemStation, ver. B.03.01, para controle do equipamento e obtenção dos dados.

Para detecção dos analitos por meio do detector de fluorescência (FLD), comprimentos de onda de excitação (λEx) e de emissão (λEm) foram selecionados a partir de espectros obtidos no cromatógrafo (1200 series, Agilent).

Diferentes fatores (Tabela 8) foram avaliados buscando-se seletividade e boa resolução dos picos cromatográficos correspondentes aos analitos de interesse, bem como tempo de corrida não superior a 10 min. Exatidão, resolução cromatográfica e aspecto visual do cromatograma foram as variáveis verificadas para avaliação das respostas às alternativas

dos fatores.

Neste trabalho, entende-se por aspecto visual a observação de ausência de picos interferentes no tempo de retenção (t_R) dos analitos de interesse, baixo nível de ruído na linha de base e, para os picos, o formato similar a uma distribuição gaussiana com altura não inferior a 0,1 e simetria com valor de $1,0 \pm 0,5$ (DOLAN, 2003).

Tabela 8 - Fatores estudados no estabelecimento de condições cromatográficas.

Fator	Alternativas
Tipo de coluna	Zorbax C18-SB e Licrospher C18-PAH (ambas 4,6 x 250 mm, 5 μ m, Agilent)
Temperatura da coluna	27 °C e 40 °C
Vazão da FM	0,75 e 1,00 mL.min ⁻¹
Gradiente da FM	Diversos

Mesmo ambas as colunas sendo baseadas em C18, a Licrospher (Tabela 8) tem seu adsorvente melhorado para interações com hidrocarbonetos poliaromáticos, o que a difere da Zorbax que tem as moléculas de C18 capeadas, de modo a diminuir a presença de grupos silanóis disponíveis para interação com as substâncias em determinação.

3.3 Validação do Método Cromatográfico

O método cromatográfico, destinado à análise de substâncias em baixas concentrações da ordem de ng.L⁻¹, foi validado com base no guia orientativo “Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos” (INMETRO, 2011) e nos artigos de Ribani et al. (2004), Ribeiro et al. (2008) e Silva; Silva e Druzian (2010). Foram avaliadas as variáveis: precisão, seletividade, exatidão, recuperação, robustez, sensibilidade, linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação.

Segundo Albano e Raya-Rodriguez (2009), a Validação de Métodos Laboratoriais requer a avaliação das variáveis de desempenho por meio de diversos ensaios analíticos, empregando a análise de padrões e/ou amostras reais, ou com características próximas a estas amostras, fortificadas com padrões de valores conhecidos. Posteriormente, é feita a análise estatística.

Portanto, todos os ensaios de validação foram conduzidos usando-se amostras-testemunha fortificadas com padrões de E2 e EE2 em diferentes concentrações, variando de 7,5 ng.L⁻¹ a 250 ng.L⁻¹. As amostras de água (amostras-testemunha) foram coletadas em São Carlos, SP, no Córrego do Monjolinho em ponto sob as coordenadas 21°59'52,69"S e 47°53'47,91"O. Em busca de menor interferência de substâncias das margens do corpo hídrico no processo de validação, atentou-se para que chuvas não tenham ocorrido a menos de

24 horas quando da coleta de amostra.

Na Tabela 9 são apresentadas as médias de algumas variáveis físico-químicas como forma de comparação de qualidade das amostras de água do córrego do Monjolinho (amostras-testemunha) e do rio Itapecuru (amostras investigadas). Nota-se que o Monjolinho apresentou característica mais límpida, menos cor e menos turbidez, em relação ao Itapecuru, situação desejada uma vez que a água do córrego destinou-se à calibração do método cromatográfico, por meio da técnica de superposição da matriz (RIBANI et al., 2008).

Tabela 9 - Média dos indicadores de qualidade de água: turbidez, cor e pH das amostras do córrego Monjolinho e do rio Itapecuru.

Parâmetro físico-químico	Córrego do Monjolinho (São Carlos, SP) n=5 (de março a junho de 2013)	Rio Itapecuru (Bacabeira, MA) n=10 (setembro de 2013)
Turbidez (uT)	10,7	44,4
Cor (ptCo)	93,5	170,8
pH	6,29	6,84

A validação foi iniciada somente após o estabelecimento das condições cromatográficas e de preparo de amostra testados usando-se água ultrapura (resistividade=18,2 MΩ.cm) fortificada com padrões de E2 e EE2 em diferentes concentrações (níveis). Deste modo, foi possível avaliar a resposta do método (SPE-HPLC/FLD) às substâncias estudadas em condições consideradas ideais. Com base nestas respostas, procedeu-se ao estudo do método com amostras-testemunha as quais foram submetidas a todas as etapas do método.

Embora neste documento os parâmetros avaliados para a validação do método estejam organizados em tópicos, na prática foram avaliados em conjunto, tornando possível a avaliação simultânea de diferentes parâmetros a partir de um mesmo grupo de análises.

3.3.1 PRECISÃO

A precisão do método foi verificada por meio da repetitividade e da precisão intermediária, sendo expressas pelo desvio padrão relativo (DPR), ou coeficiente de variação (CV). Este foi calculado segundo a equação 1.

$$CV (\%) = DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (1)$$

DP: desvio padrão;

CMD: concentração média determinada.

O desvio-padrão (DP) para cada nível de precisão foi calculado segundo equações específicas, apresentadas a seguir, e mediante um planejamento experimental para cada situação.

Portanto, para a determinação da repetitividade, a triplicata de amostras fortificadas foi analisada em duplicata de injeção, totalizando seis valores ($n=6$) em cada concentração (nível) para os cálculos conforme a equação 2. A repetitividade foi avaliada em 3 níveis da curva de calibração, sendo eles 25, 50 e 75 ng.L⁻¹, para ambos os analitos.

$$DP = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n - 1)}} \quad (2)$$

x : resposta do equipamento para cada injeção de amostra;

$\bar{x}$: média aritmética das respostas do equipamento (LU);

n : número total de injeções para cada concentração.

A precisão intermediária foi determinada calculando-se o desvio padrão segundo a equação 3 (INMETRO, 2011). Foram utilizadas amostras-testemunha fortificadas nos níveis 25 e 50 ng.L⁻¹, em dois diferentes dias, para cada analito.

$$Spi_{(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{T(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2} \quad (3)$$

T : total de amostras testadas;

n : total de testes realizados por amostra;

j : número da amostra, com j variando de 1 a T ;

k : número do teste da amostra j , com k variando de 1 a n ;

y_{jk} : valor do resultado k para amostra j ;

$\bar{y}_j$: média aritmética dos resultados da amostra j .

3.3.2 SELETIVIDADE

Através da seletividade demonstra-se a habilidade do método de identificar e quantificar o analito na presença de interferentes da matriz de estudo.

A avaliação da seletividade foi realizada visualmente comparando-se cromatogramas

obtidos a partir da análise com o branco da amostra (H₂O ultrapura) e com amostra-testemunha fortificada e não fortificada.

3.3.3 EXATIDÃO E RECUPERAÇÃO

A exatidão pode ser interpretada como o grau de correspondência entre o valor medido e um valor de referência considerado verdadeiro, e está relacionada com o erro absoluto de uma medida (RIBEIRO et al., 2008).

A exatidão e a recuperação foram avaliadas em todos os níveis da curva analítica. A primeira foi calculada relacionando os valores observados (área do pico) para o padrão, sem passar por SPE, com as áreas observadas para amostra-testemunha fortificada com a mesma concentração de padrão após ser submetida ao método completo, incluindo o preparo de amostra. Os valores foram obtidos a partir de ensaios de recuperação e a exatidão calculada conforme a equação 4.

$$exatidão = \frac{valor\ medido}{valor\ de\ referência} \times 100\% \quad (4)$$

valor medido: área obtida com amostra-testemunha;

valor de referência: área obtida com padrão.

Para INMETRO (2011), o cálculo segundo a equação 4 corresponde à figura de mérito denominada tendência, sendo que a partir desta a exatidão pode ser numericamente avaliada.

Portanto, entende-se que resultados em torno de 100% são desejáveis para a exatidão, pois indicam similaridade entre o valor observado e o valor esperado, não indicando tendência a sub ou a superestimação da real concentração do analito presente na amostra. Caso contrário, o método deve ser alterado a fim de se obter valores na faixa considerada adequada (70 a 120 %).

A recuperação do analito foi estimada a partir da fortificação de amostras-testemunha com quantidades conhecidas de cada estrógeno, posterior análise cromatográfica e cálculo segundo a equação 5. As amostras-testemunha foram fortificadas com o analito em todos os pontos de concentração usados na construção da curva analítica.

$$recuperação\ (\%) = \left(\frac{C1 - C2}{C3} \right) \times 100 \quad (5)$$

C1: concentração do analito na amostra fortificada;

C2: concentração do analito na amostra não fortificada;

C3: concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

Diferentemente do cálculo para exatidão, as concentrações usadas na equação 5 foram calculadas a partir da área do pico de cada analito e da equação da reta da faixa linear (curva de calibração) do método. A partir da relação entre estes fatores é que foram calculadas as concentrações desconhecidas dos analitos em amostras reais. Portanto, a estimativa de recuperação desta forma engloba também erros (resíduos) que possam ocorrer em virtude da regressão linear para a construção da curva analítica.

3.3.4 ROBUSTEZ

Este parâmetro foi avaliado usando-se como ferramenta o teste de Youden (GREENBERG; EATON, 2005; CÉSAR; PIANETTI, 2009; GEHRING et al., 2011), que além de avaliar a robustez, permite ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais do método. Este teste indica qual o tipo e o grau de influência de cada uma dessas variações. Quanto maior a robustez do método, tanto maior é a confiança na sua precisão.

A Tabela 10 apresenta os parâmetros avaliados no teste de Youden e a relação de cada um com a etapa do método analítico.

Tabela 10 - Parâmetros selecionados para verificação de robustez segundo teste de Youden.

Etapa no método	Parâmetro	Nominal		Alternativo	
Acidificação	ácido	H ₂ SO ₄	A	HCl	a
	pH	2,0 ± 0,5	B	3,0 ± 0,5	b
SPE	solvente de eluição	ACN	C	MeOH	c
	volume de lavagem com H ₂ O	2x5 mL	D	5 mL	d
	fornecedor cartucho C18	SampliQ	E	Strata	e
Análise cromatográfica	temperatura da coluna (°C)	40 ± 0,5	F	35 ± 0,5	f
	vazão (mL.min ⁻¹)	1 ± 1%	G	0,8 ± 1%	g

Na Tabela 11 é apresentado o planejamento experimental para a obtenção dos dados que foram usados nos cálculos e avaliação de robustez do método. Para realização dos experimentos utilizou-se amostra-testemunha fortificada ao nível de 50 ng.L⁻¹, ponto médio da curva analítica, região onde o intervalo de confiança é mais estreito e portanto resulta em respostas estatisticamente mais confiáveis.

Tabela 11 - Planejamento experimental para teste de robustez conforme Youden.

Parâmetro	Codificação do experimento							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Ácido	A	A	A	A	a	a	a	a
pH	B	B	b	b	B	B	b	b
solvente eluição	C	c	C	c	C	c	C	c
volume de H ₂ O	D	D	d	d	d	d	D	D
fornecedor C18	E	e	E	e	e	E	e	E
temp. coluna (°C)	F	f	f	F	F	f	f	F
vazão (mL.min ⁻¹)	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultados	s	t	u	v	w	x	y	z

Cada combinação experimental foi analisada em triplicata e a média destas foi usada nos cálculos. A influência de cada um dos sete parâmetros frente aos analitos foi avaliada verificando-se as respostas para área do pico, exatidão, tempo de retenção e resolução. Os resultados permitiram avaliar o tipo de efeito (positivo ou negativo) e a significância deste para a identificação e quantificação de cada analito.

Os valores dos efeitos para cada parâmetro (E_x) foi calculado segundo a equação 6.

$$E_x = \frac{\sum Y(+1) - \sum Y(-1)}{N/2} \quad (6)$$

Y(+1): resultados para experimentos onde foram usados valores nominais (letras maiúsculas) de um determinado parâmetro;

Y(-1): resultados para experimentos onde foram usados valores alternativos (letras minúsculas) de um determinado parâmetro;

N: número total de análises (replicatas) de todos parâmetros.

Para verificação de significância do efeito, o valor de referência $E_{crítico}$ obtido a partir do $t_{crítico}$ ($\alpha=0,05$ e GL = 23) foi calculado conforme a equação 7.

$$E_{crítico} = t_{crítico} \cdot (SE)_e \quad (7)$$

$(SE)_e$: erro padrão dos resultados das análises (replicatas) de todos parâmetros.

Sendo o erro padrão $(SE)_e$ calculado de acordo com a equação 8.

$$(SE)_e = \sqrt{\frac{2s^2}{N/2}} \quad (8)$$

s: desvio-padrão dos resultados das análises (replicatas) de todos experimentos para cada parâmetro.

Deste modo, o efeito e a significância de cada parâmetro no método foram avaliados comparando-se os valores de $|E_x|$ ao valor crítico $E_{crítico}$. Efeitos significativos são observados quando $|E_x|$ é maior que $E_{crítico}$.

3.3.5 LINEARIDADE, SENSIBILIDADE E FAIXA DE TRABALHO

Antes de se estabelecer o procedimento de preparo de amostra e após o estabelecimento das condições cromatográficas, estes parâmetros foram avaliados para o sistema cromatográfico a partir da análise de padrões analíticos preparados em MeOH e em concentrações variando de 30 a 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Posteriormente, já com o procedimento de preparo de amostra desenvolvido, estes mesmos parâmetros foram avaliados em amostra-testemunha na faixa de 7,5 a 125 ng.L^{-1} , considerando-se nos cálculos o fator de concentração alcançado na SPE.

A faixa linear foi identificada por meio da padronização externa, fazendo uso da superposição de matriz (RIBANI et al., 2008), de forma que a equação da reta (9) representasse a correlação entre a área do pico cromatográfico e a concentração de analito na amostra.

$$y = bx + a \quad (9)$$

y : resposta medida (área do pico);

x : concentração;

a : interseção com o eixo y , quando $x = 0$;

b : inclinação da curva analítica = sensibilidade.

A curva analítica foi determinada com seis níveis de concentração, sendo avaliadas a precisão e a exatidão de cada um. Verificou-se a linearidade mediante o cálculo do coeficiente de determinação (R) e a construção de dois gráficos. Em um deles, foram plotados os valores dos resíduos das concentrações ($x_{\text{calculado}} - x_{\text{nominal}}$) para cada nível de concentração. A distribuição irregular e uniforme dos pontos no gráfico, e cuja média seja igual a zero, indica a linearidade das respostas e a ausência de erro sistemático nos resultados do método (RIBEIRO et al., 2008).

No outro, a resposta relativa de cada nível (eixo y) foi plotada em função das respectivas concentrações em escala logarítmica (eixo x). A resposta relativa foi obtida da divisão da resposta analítica (área do pico) por sua concentração nominal correspondente. Os pontos no gráfico indicam linearidade quando a oscilação destes valores, no eixo das abscissas, mantém-se no intervalo de 95% a 105% da média das respostas relativas (RIBANI et al., 2008).

Em todos estes casos, os valores usados da resposta analítica (área do pico cromatográfico) correspondem à média da análise em triplicata (n=3) de cada nível de concentração.

A partir das médias das áreas, calculou-se o limite de confiança de cada nível por meio da equação 10.

$$\pm t_{(n-1, \alpha=0,05)} \cdot DP/\sqrt{n} \quad (10)$$

$t_{(n-1, \alpha=0,05)}$: t de Student com n-1 graus de liberdade e significância de 95%;

DP : desvio-padrão das análises;

n : número de análises.

A sensibilidade do método é observada pelo valor de “b” na equação da reta. Quanto maior o valor deste termo, maior a inclinação da reta, indicando significativa variação na resposta frente a pequena variação na concentração do analito, ou seja, maior sensibilidade do método.

Neste trabalho, optou-se por considerar a faixa de trabalho como sendo a faixa de menores concentrações testadas que apresentou linearidade. Ou seja, esta coincidiu com a faixa linear do método.

3.3.6 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Ambos os parâmetros foram determinados com base em parâmetros da curva analítica para E2 e para EE2. Trata-se de um método considerado robusto em função da maior confiabilidade estatística que apresenta. Nele, o intervalo de confiança (Equação 10) da regressão é considerado nos cálculos. Desta forma, o LD pode ser definido como a concentração mínima em que uma substância pode ser medida e informada com 95% de confiança. Para ser considerada LQ, além desta condição, a concentração mínima quantificável deve atender aos limites de exatidão e precisão do método (RIBEIRO et al., 2008).

O LD foi calculado por meio das equações 11, 12, 13 e 14.

$$LD = 2 \cdot \frac{S_y \cdot t}{b} \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{n}\right) + 1 + \frac{(y_c - \bar{y})^2}{b^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (11)$$

S_y : desvio padrão do ajuste linear (equação 12) da curva analítica;

t : t de Student (GL = $n-1$ e $\alpha=0,05$);

b : coeficiente angular da equação da curva analítica linear;

n : número de padrões de calibração utilizados na construção da curva;

y_c : y crítico, calculado segundo equação 14;

$\bar{y}$: média das respostas analíticas considerando-se todos os níveis da curva;

x_i : concentração nominal do nível da curva;

$\bar{x}$: média das concentrações de x_i .

No caso deste trabalho, n é igual a 6 e t de Student é igual a 2,5706 para GL = 5. S_y é o desvio padrão para o ajuste linear calculado conforme a equação 12.

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad (12)$$

Com y_i sendo o valor médio ($n=3$) da resposta analítica de cada nível da curva; e $\hat{y}_i$, a resposta analítica, correspondente à concentração nominal (x_i), calculada a partir da equação da curva analítica, conforme a equação 13. Neste caso, os valores do coeficiente angular (b) e do linear (a) já devem ser conhecidos.

$$\hat{y}_i = a + bx \quad (13)$$

$$y_c = a + S_y \cdot t \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{n}\right) + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (14)$$

As equações 12, 15, 16 e 17 foram usadas no cálculo do LQ.

$$LQ = \left(\frac{y_h - a}{b}\right) + \left(\frac{S_y \cdot t}{b}\right) \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{n}\right) + 1 + \frac{(y_h - \bar{y})^2}{b^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (15)$$

y_h : calculado conforme equação 16;

- a : coeficiente linear da equação da curva analítica linear;
 b : coeficiente angular da equação da curva analítica linear;
 S_y : desvio padrão do ajuste linear (equação 12) da curva analítica;
 t : t de Student ($GL = n-1$ e $\alpha = 0,05$);
 n : número de padrões de calibração utilizados na construção da curva;
 $\bar{y}$: média das respostas analíticas considerando-se todos os níveis da curva;
 x_i : concentração nominal do nível da curva;
 $\bar{x}$: média das concentrações de x_i .

Para o cálculo de y_h (equação 16) em relação ao de LQ, a exceção nas variáveis usadas no cálculo é o termo x_c que é calculado de acordo com a equação 17.

$$y_h = a + 2 \cdot S_y \cdot t \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{n}\right) + 1 + \frac{(x_c - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (16)$$

$$x_c = \left(\frac{S_y \cdot t}{b}\right) \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{n}\right) + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (17)$$

3.4 Conservação e Transporte de Amostras do Rio Itapecuru

A distância entre o local de estudo, com ponto de coleta em Bacabeira, MA, e o laboratório de realização das análises cromatográficas, localizado no IQSC/USP (São Carlos, SP), torna importante a garantia da estabilidade dos analitos da amostra coletada. Ademais, é sabido que menores volumes tem menor custo e maior facilidade de transporte, o que torna interessante a redução do volume de amostra a ser transportado.

A SPE é uma técnica que possibilita ao usuário, sem prejuízo ao método analítico, a interrupção do procedimento de extração entre a lavagem do cartucho e a eluição dos analitos. Desta forma, os analitos podem ser mantidos sorvidos no material adsorvente por período que mantenha nível adequado de recuperação (70 a 120%). O teste de estabilidade realizado neste trabalho procurou identificar por quantos dias, até a análise instrumental, as condições escolhidas de conservação da amostra e de transporte dos analitos atendem a esta condição.

Tendo em vista a logística de coleta, preparo e transporte de amostras, estimou-se período máximo de 5 dias desde a coleta até o final da análise em laboratório. As amostras foram conservadas acidificadas (pH 2,0) e refrigeradas (4 °C) até o preparo para análise instrumental. Para transporte e acondicionamento, os cartuchos foram colocados em bolsas

plásticas com fechamento tipo zip, sob vácuo de 0,5 atm (381 mmHg) e refrigeração de 4 °C.

Portanto, verificou-se a estabilidade dos analitos nas condições anteriormente descritas em período de 3, 4 e 5 dias de acondicionamento em cartucho. A resposta avaliada foi o percentual de exatidão da concentração dos hormônios.

3.5 Coleta de Amostras do Rio Itapecuru

Foram feitas 2 campanhas de coleta, ocorrendo nos períodos de 10 a 14 de setembro de 2013 e de 17 a 21 de setembro de 2013. Época do ano que, segundo Ministério do Meio Ambiente... (2006), é considerada de estiagem na região (ANEXO A).

As amostras foram coletadas após a captação da água do rio Itapecuru e antes da entrada na Estação de Tratamento de Água (ETA) do Sistema ITALUÍS (CAEMA), em um determinado horário a cada dia. Foram escolhidos horários, de modo que ao longo dos 5 dias de cada campanha, cada coleta representasse um período diferente do dia (Tabela 12).

Tabela 12 - Datas de coleta das amostras de água do rio Itapecuru, organizadas por hora e período.

Hora	Campanha 1	Campanha 2
14:40	10/09/2013	17/09/2013
10:30	11/09/2013	18/09/2013
17:50	12/09/2013	19/09/2013
22:00	13/09/2013	20/09/2013
06:20	14/09/2013	21/09/2013

Esta foi uma opção frente à dificuldade de se identificar um possível período em que, águas com maiores concentrações dos contaminantes de interesse, possivelmente sejam captadas para o tratamento na ETA. Fontes difusas de poluição; longa distância (cerca de 56 km) de aglomeração urbana (Itapecuru-Mirim), com pouco mais de 60 mil habitantes, segundo o censo 2010, à margem do rio e a jusante da captação; bem como a grande variação de vazão do rio; além da ausência de informações atualizadas sobre a vazão do rio (MINISTÉRIO DO MEIO..., 2006), são os principais fatores que dificultaram estimar-se tal horário.

Contudo, a programação desta forma, pode possibilitar a identificação de oscilação na concentração dos hormônios estradiol e etinilestradiol, caso estas substâncias sejam detectadas nas amostras do rio.

Às amostras coletadas em duplicata, em frascos de vidro âmbar com capacidade de 1 litro, foi adicionado H₂SO₄ 96% para ajustar o pH a próximo de 2. Em seguida, os frascos de

coleta foram acondicionados em caixas térmicas com gelo e transportados para o NARP (UFMA), onde foram armazenados sob refrigeração (4 °C) até o momento do preparo da amostra.

3.6 Destinação de Resíduos

Os resíduos gerados foram acondicionados em recipientes apropriados, etiquetados e estocados em local ventilado até serem encaminhados ao setor de tratamento de resíduos da UFMA ou ao Laboratório de Resíduos Químicos do Campus - USP, para serem devidamente tratados e/ou descartados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise Cromatográfica

Os comprimentos de onda de excitação (λ_{Ex}) e de emissão (λ_{Em}) para cada analito foram selecionados a partir de inspeção visual dos espectros de excitação e de emissão mostrados na Figura 22. Os pontos máximos do espectro foram os selecionados para o desenvolvimento do método, pois indicam regiões de comprimento de onda onde os analitos apresentam boa absortividade e emissão fluorescente.

As substâncias de interesse apresentaram espectros similares, principalmente por terem estruturas moleculares semelhantes e os mesmos grupos fluorescentes. Esta característica facilitou a escolha de λ_{Ex} e de λ_{Em} , sendo eles 255 nm e 314 nm, respectivamente.

Figura 22 - Espectros de emissão e de excitação dos estrógenos. No detalhe o ápice dos espectros evidenciando o comprimento de onda.

A Tabela 13 apresenta condições de fase móvel (FM), temperatura e vazão testadas, as quais foram adaptadas de Verbinnen et al. (2010) e Ye et al. (2013). Para cada teste, usou-se solução padrão preparada em acetonitrila (ACN), à concentração de $250 \mu\text{g.L}^{-1}$, e a coluna cromatográfica Lichrospher C18-PAH.

Tabela 13 - Condições cromatográficas testadas no desenvolvimento do método.

Condição	n. 1 (Verbinnen et al., 2010)	n. 2 (Ye et al., 2013)
Gradiente FM	0 min (10% B); 5 min (50% B); 15 min (54% B)	0 min (55% B); 7,6 min (50% B); 8 min (50% B); 10 min (55% B)
Temperatura (°C)	27 e 40	27 e 40
Vazão (mL.min ⁻¹)	1,00	0,75 e 1,00

Fase móvel (FM) constituída por H₂O ultrapura (A) e ACN (B).

A condição n. 1, sob 27 °C, apresentou tempo de retenção (t_R) dos analitos de aproximadamente 12 min. Aumentando-se a temperatura para 40 °C, os t_R diminuíram e ficaram ao redor de 11 min, contudo ainda em t_R superior ao limite pretendido de 10 min.

Prosseguindo-se com os testes, a condição n. 2, sob 27 °C e 1 mL.min⁻¹, resultou em t_R de 5,0 e 5,3 min, entretanto com resolução inadequada ($R < 1,5$) dos picos. Este mesmo problema de resolução ocorreu ao se aumentar a temperatura para 40 °C e ao se diminuir a vazão para 0,75 mL.min⁻¹, alcançando-se t_R máximo de 6,7 e 7,1 min, para E2 e EE2, respectivamente. Resolução inadequada pode acarretar dificuldade no cálculo da área dos picos, causando imprecisão, inexatidão, falta de linearidade na relação área-concentração e aumento dos valores de LD e LQ do método.

A partir destes resultados e alterando-se o gradiente da fase móvel (FM) estabeleceu-se uma terceira condição cromatográfica que resultou em boa resolução ($R \approx 3,5$) com t_R de 8,6 e 9,2 min, sob 40 °C e vazão de 1 mL.min⁻¹.

Já com as condições de temperatura, vazão e FM definidas, verificou-se a resposta do sistema cromatográfico ao se usar a coluna Zorbax C18-SB, com fase estacionária mais comumente encontrado em laboratórios de pesquisa, e geralmente de menor custo, como alternativa à coluna Lichrospher C18-PAH, cujo material de empacotamento é indicado para separação de hidrocarbonetos poli-aromáticos.

Embora a troca da Lichrospher pela Zorbax tenha aumentado os t_R de E2 e EE2 de 8,6 min e 9,1 min para 9,3 min e 10,6 min, os picos apresentaram forma mais definida proporcionando melhor detectabilidade dos analitos e possibilidade de se alcançar LQ e LD menores.

Na Tabela 14 são apresentadas as condições cromatográficas selecionadas para o prosseguimento do estudo à etapa dos testes de preparo de amostra.

Tabela 14 - Condições cromatográficas do método.

Constituintes da FM	H ₂ O ultrapura (A); ACN (B)
Gradiente da FM	0 min (10% B); 2 min (50% B); 10 min (53% B); 11 min (55% B); 15 min (10% B)
Vazão	1 mL.min ⁻¹
Coluna	Zorbax C18 SB (4,6 x 250 mm, 5µm, Agilent)
Temperatura da coluna	40 °C
Volume de injeção	20 µL
Comprimentos de onda	λ_{Ex} 255 nm; λ_{Em} 314 nm

FM: fase móvel; ACN: acetonitrila.

4.2 Preparo de Amostra

A acidificação da amostra mostrou-se de fundamental importância, visto que a

utilização deste artifício tornou consistentes os resultados de exatidão. Na Figura 23 observa-se que tanto ácido sulfúrico (H_2SO_4) quanto ácido clorídrico (HCl) apresentaram resultados dentro do considerado adequado para análise em nível de traço. Neste teste usou-se amostra-testemunha fortificada com $400 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cada analito.

Figura 23 - Comparação da exatidão entre o uso de HCl e H_2SO_4 na acidificação da amostra-testemunha fortificada com $400 \mu\text{g.L}^{-1}$ de E2 e EE2.

Conforme é demonstrado na Figura 24, excetuando-se a membrana de nylon (NY), pouca diferença foi observada entre as membranas filtrantes. A membrana de acetato de celulose (AC) resultou em baixa exatidão para a análise de EE2. Dentre as membranas testadas a de fibra de vidro (FV) e a de celulose regenerada (CR) foram as que apresentaram melhores resultados. Portanto, tendo em vista as condições práticas do laboratório, optou-se por usar a FV, ficando a CR como uma segunda opção.

Figura 24 - Exatidão observada para cada membrana filtrante testada. Amostra-testemunha fortificada com $400 \mu\text{g.L}^{-1}$ de E2 e EE2.

NY = nylon; CR = celulose regenerada; AC = acetato de celulose; FV = fibra de vidro.

Os testes de lavagem do cartucho SPE e de solventes de eluição e de condicionamento foram realizados conjuntamente. Na Figura 25 nota-se que melhor exatidão foi encontrada, para ambos analitos, fazendo-se a lavagem do cartucho com 10 mL de H₂O ultrapura, em conjunto com o condicionamento e a eluição usando-se ACN.

Figura 25 - Comparação das tendências entre o uso de ACN e MeOH como solventes de condicionamento e de eluição, com e sem lavagem de cartucho SPE. Amostra-testemunha fortificada com 400 µg.L⁻¹ de E2 e EE2.

ACN+lavagem = acetonitrila mais lavagem com H₂O ultrapura

MeOH+lavagem = metanol mais lavagem com H₂O ultrapura

Acetonitrila (ACN) foi o solvente escolhido para uso na reconstituição do extrato após secagem sob N₂ gasoso. Os volumes de 400 µL e 100 µL, testados na reconstituição do extrato, apresentaram resultados similares, tanto em relação à exatidão, quanto às características do sinal cromatográfico (área, altura, largura e fator de simetria do pico).

Portanto, tendo em vista se conseguir LD e LQ menores, optou-se por reconstituir o extrato com 100 µL (ou 0,1 mL). Observando que o volume de amostra adicionado em cada cartucho SPE é 400 mL, consegue-se um fator de concentração (Fc) igual a 4000 (400 mL ÷ 0,1 mL). Desta forma, uma substância que produz um sinal analítico correspondente à concentração de 50 µg.L⁻¹ no extrato, indica que sua concentração na amostra é 12,5 ng.L⁻¹ (50 µg.L⁻¹ ÷ 4000), por exemplo.

Como resultado de todas as variáveis analisadas no desenvolvimento do método, chegou-se ao método descrito na Figura 26, o qual foi submetido ao processo de validação tendo como referência as publicações de INMETRO (2011), Ribani et al. (2004), Ribeiro et al. (2008) e Silva; Silva e Druzian (2010).

Figura 26 - Fluxograma do método SPE/HPLC-FLD para análise de E2 e EE2.

4.3 Validação

O comportamento das moléculas dos analitos, em relação à excitação e emissão de radiação fluorescente, demonstra que estradiol tem espectro com maiores intensidades que etinilestradiol, conforme observa-se na Figura 20, item 4.1. Esta condição provavelmente contribuiu para que E2 e EE2 resultassem em LQ e LD diferentes, sendo estes mais elevados para EE2. Na Tabela 15 é apresentado resumo dos dados obtidos na validação do método.

Tabela 15 - Resultados das figuras de mérito da validação do método.

Figura de mérito		estradiol	etinilestradiol
Faixa de linear (ng.L ⁻¹)		12,5 a 75	25 a 100
LD* e LQ* (ng.L ⁻¹)		6,96 e 10,36	20,78 e 29,33
Curva analítica linear		$y=1,2863x+2,7844$	$y=1,3808x+0,42$
Coeficiente de determinação (R)		0,9992	0,9950
Precisão média (mín-máx) em DPR (%)		3,08 (0,40 - 6,08)	2,26 (0,98 - 4,07)
Precisão intermediária (%)	25 ng.L ⁻¹	7,06	5,72
	50 ng.L ⁻¹	6,81	10,71
Exatidão média (mín-máx) em %		78,05 (74,18 - 82,04)	92,06 (86,60 - 96,34)
Recuperação média (mín-máx) em %		99,24 (91,11 - 102,58)	99,71 (95,69 - 104,84)

* LD = limite de detecção e LQ = limite de quantificação. Os valores indicados como média correspondem à média aritmética (n=6) das médias calculadas (n=3) para cada nível de concentração.

A faixa de trabalho foi estabelecida com uma única curva analítica para cada analito, cuja linearidade foi constatada. Ademais, foi verificado atendimento aos limites de precisão, exatidão e recuperação para cada ponto da curva (Tabela 15).

A Figura 27 mostra a curva analítica construída para cada analito. Também são apresentados a equação da reta e o gráfico de resíduos. A barra de erro nos pontos que constituem a curva indica o limite de confiança ($\alpha=0,05$). O coeficiente de linearidade maior que 0,99 e a dispersão irregular dos resíduos ao redor de zero dão confiabilidade quanto à linearidade da reta.

Figura 27 - Curvas analíticas do método e gráfico de resíduos da concentração (eixo x) para cada estrógeno. Condições cromatográficas: FM ACN:H₂O (gradiente), vazão: 1 mL.min⁻¹, vol. injeção de 20 µL, λ_{Ex} = 255 nm, λ_{Em} = 315 nm, temp. = 40 °C.

Condição esta confirmada também por meio dos gráficos mostrados na Figura 28. Nela, observa-se que os pontos nos gráficos estão distribuídos ao redor de um valor médio e dentro da área localizada entre 95% e 105% deste valor médio.

Figura 28 - Representação gráfica da faixa linear do método através da razão resposta analítica/concentração vs. concentração em escala logarítmica.

Valores máximo e mínimo aceitáveis, correspondendo a 95% e 105% do valor médio (---).
Valor médio (—).

A seletividade do método foi verificada por comparação dos cromatogramas obtidos com a injeção de: uma solução padrão à concentração de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$; uma amostra-testemunha não fortificada; e de uma amostra-testemunha fortificada a $12,5 \text{ ng.L}^{-1}$, cuja concentração correspondeu à da solução padrão, ao se considerar o fator de concentração ($F_c=4000$). Esta comparação é demonstrada na Figura 29, onde se observa que não há sinal interferente ao nível do LQ no t_R (9,3 min e 10,6 min) dos estrógenos.

Figura 29 - Sobreposição de cromatogramas demonstrando a seletividade do método. Condições cromatográficas: FM ACN:H₂O (gradiente), vazão: 1 mL.min^{-1} , vol. injeção de $20 \mu\text{L}$, $\lambda_{\text{Ex}} = 255 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 315 \text{ nm}$, temp. = 40°C .

A linha tracejada nos diagramas da Figura 30 indica o valor correspondente ao efeito crítico. Quando as barras de efeito para cada fator ultrapassa esta linha, entende-se que aquele fator resulta em alteração significativa no resultado do método. Desta forma, esse fator deve ser controlado com mais de rigor, reduzindo ao mínimo quaisquer variações em relação à condição padrão. A Tabela 16 denota de um modo diferente os resultados apresentados na Figura 30.

A avaliação de robustez (Figura 30 e Tabela 16) mostrou que o método é robusto frente aos fatores: tipo de ácido (HCl; H₂SO₄) usado na acidificação da amostra; e fornecedor (Agilent; Phenomenex) de cartucho C18 para SPE. A alteração do solvente (ACN; MeOH) usado no condicionamento e na eluição de cartuchos SPE foi significativa ($\alpha=0,05$) apenas para estradiol. A resolução do pico para etinilestradiol não apresentou alteração significativa ($\alpha=0,05$) para qualquer um dos fatores. Para ambos os hormônios, t_R foi o parâmetro afetado por mais fatores (pH da amostra, lavagem do cartucho SPE, temperatura da coluna e vazão da FM). Para EE2, a variação do pH da amostra e alteração na lavagem do adsorvente do cartucho SPE foram os fatores que causaram efeito significativo ($\alpha=0,05$) em mais parâmetros. Já para E2, isto foi observado na alteração do solvente de condicionamento e

eluição, quando 3 dos 4 parâmetros verificados apresentaram alteração significativa ($\alpha=0,05$).

Figura 30 - Diagramas de efeito do teste de robustez (Youden).

Tabela 16 - Visualização dos parâmetros influenciados pelos diferentes fatores através do teste de robustez (Youden).

Fator	Parâmetro							
	E2				EE2			
	área	exatidão	t _R	resolução	área	exatidão	t _R	resolução
Ácido	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
pH	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Solvente	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Lavagem	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Fornecedor C18	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Temp coluna	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Vazão FM	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde

Vermelho indica que o fator influenciou significativamente ($\alpha=0,05$). Verde indica que não ocorreu influência significativa.

Portanto, o método foi robusto frente à alteração no ácido usado para acidificação da amostra (HCl ou H₂SO₄), como também à troca de fornecedor (Agilent; Phenomenex) no cartucho SPE C18. Notou-se que ocorrendo alteração na temperatura da coluna (40 °C; 35 °C)

ou na vazão da FM ($1,0 \text{ mL.min}^{-1}$; $0,8 \text{ mL.min}^{-1}$), apenas o t_R dos analitos foi alterado comprometendo basicamente o tempo de corrida do método. Já os fatores: pH da amostra (2,0; 3,0); solvente de condicionamento e eluição (ACN, MeOH); e lavagem do cartucho SPE com H_2O ultrapura ($2 \times 5 \text{ mL}$; 5 mL), foram fatores que apresentaram importantes alterações nos parâmetros de resposta do método. Portanto, o método não foi robusto frente a estes 3 fatores, os quais não podem ser alterados sem acarretar resultados significativamente diferentes.

4.4 Conservação da Amostra e Estabilidade dos Analitos

O presente método desenvolvido e validado é destinado à aplicação em análise de amostras de água de rios, os quais geralmente se encontram em regiões distantes da localização dos laboratórios. Tendo em vista a necessidade do envio das amostras coletadas no rio Itapecuru, em Bacabeira-MA, para o laboratório no IQSC, em São Carlos-SP, verificou-se a estabilidade dos analitos na amostra, frente a determinadas condições de conservação da amostra, conforme descrito no item 3.7.

Na Figura 31 observa-se que, do terceiro para o quarto dia, o valor de exatidão para EE2 reduziu a ponto de ficar abaixo da faixa de valores considerada adequada. No dia 5, tais valores diminuíram ainda mais, resultando, para ambos analitos, em exatidão abaixo do requerido.

Figura 31 - Variação de recuperação em função de dias de conservação de analitos em cartucho SPE. Armazenamento sob refrigeração a 4°C .

Dentre os dias de armazenamento dos cartuchos SPE em que a estabilidade dos analitos foi avaliada, encontrou-se que um período de conservação dos analitos em adsorvente SPE C18 superior a 3 dias é inadequado para o método. Portanto, E2 e EE2 podem ser mantidos em cartucho SPE C18, sem prejuízo ao método, por um período de até 3 dias, no

máximo, desde que armazenados em refrigeração a 4 °C e embalados adequadamente (item 3.4).

Entende-se que o principal motivo da considerável diminuição de recuperação de um dia para o outro, seja a ocorrência de uma adsorção irreversível dos analitos na fase estacionária C-18. Esta pode ser uma consequência do pH 2 utilizado no preparo da amostra, conforme descrito para o método aqui desenvolvido. Embora exista informação de que o adsorvente C-18 pode ser utilizado em pH na faixa de 2 a 8 (SOLID PHASE...,2014), ressalta-se que nos valores limites deve-se considerar que a amostra (ou solução) permanecerá pouco tempo em contato com C-18, de modo a não ocorrer uma forte adsorção dos analitos. Esta ressalva é contrária ao que se experimentou aqui, explicando, portanto, o resultado observado. Desta forma, para um período maior de armazenamento dos cartuchos, pode-se considerar suficiente e mais adequada a acidificação da amostra a pH 4.

4.5 Análise de Amostras do Rio Itapecuru

De acordo com os indicadores de qualidade das amostras de água do rio Itapecuru (Tabela 17) e com os valores apresentados na Figura 15, observa-se que as amostras indicam que as campanhas de coleta ocorreram na estação de águas escassas (ou estiagem). Esta observação concorda com o Ministério do Meio Ambiente (2006a) ao afirmar que de agosto a novembro a bacia do Itapecuru tem carência de chuvas.

Tabela 17 - Indicadores de qualidade das amostras de água coletadas no rio Itapecuru e resultados das determinações de estradiol e etinil-estradiol.

Número da amostra	Data da coleta	Hora da coleta	Turbidez (uT)	Cor (uH)	pH	estradiol (ng.L ⁻¹)	etinilestradiol (ng.L ⁻¹)
1	10/09/2013	14:40	73	242	6,93	ND	ND
2	11/09/2013	10:30	38	166	6,84	ND	ND
3	12/09/2013	17:50	23	128	6,92	ND	ND
4	13/09/2013	22:00	23	103	6,87	NQ	ND
5	14/09/2013	06:20	37	127	6,84	ND	ND
6	17/09/2013	14:40	47	179	6,81	13,48	ND
7	18/09/2013	10:30	56	210	6,79	ND	ND
8	19/09/2013	17:50	40	166	6,78	ND	ND
9	20/09/2013	22:00	55	197	6,88	ND	ND
10	21/09/2013	06:20	52	190	6,74	ND	ND

uT: unidade de turbidez. uH: unidade Hazen de cor. ND: não detectado. NQ: não quantificado

As amostras não indicaram a ocorrência de 17α -etinilestradiol (EE2) no rio Itapecuru, uma vez que não se obteve sinal analítico dentro da faixa de trabalho ou maior ou igual ao LD do método. Nas campanhas detectou-se somente a presença de 17β -estradiol (E2), em duas amostras (4 e 6), sendo uma em cada campanha.

É sabido que a grande maioria da população economicamente ativa, costuma ter intervalo no serviço de 12h às 14h e retornar à residência após o dia de trabalho no horário de 18h às 20h. Portanto, estas faixas horárias do dia são consideradas as de maior consumo doméstico de água e, por conseguinte, de lançamento de esgoto sanitário, principal fonte das substâncias investigadas. Curiosamente, os horários de coleta das amostras que indicaram a presença de E2 (amostra 4, às 22:00h e amostra 6, às 14:40h) foram cerca de duas horas depois destes horários (Tabela 17). Entretanto, os resultados não permitem estimar estatisticamente alguma correlação entre estas observações.

Na amostra 4, apesar de identificada a presença de E2, não foi possível quantificar a sua concentração, pois o sinal analítico foi inferior ao LQ do método. Por outro lado, a concentração de $13,48 \text{ ng.L}^{-1}$ foi encontrada na amostra 6. Este valor concorda com o encontrado por Lopes et al. (2010) no córrego Rico, próximo a Jaboticabal (SP), cujas concentrações de 17β -estradiol variaram de 8,6 a $30,6 \text{ ng.L}^{-1}$. Os autores pesquisaram a ocorrência deste hormônio em 3 diferentes pontos de coleta no córrego, perfazendo 9 amostragens para cada ponto, distribuídas em 5 meses ao longo do ano de 2006.

Moreira (2008) também relatou a ocorrência de E2 e de EE2 em amostras de água de 3 mananciais da Região Metropolitana de Belo Horizonte, bem mais populosa que a bacia do Itapecuru e que a do córrego Rico. Apesar de ter sido feito um monitoramento com coletas ao longo de 12 meses, encontrou-se E2 em não mais que 3 meses do período, e EE2, em não mais que 4 meses, considerando os resultados para um mesmo manancial. E2 apresentou-se na faixa de 1,5 a $36,0 \text{ ng.L}^{-1}$ e EE2, de 3,0 a $54,0 \text{ ng.L}^{-1}$. Portanto, a concentração encontrada de E2 ($13,48 \text{ ng.L}^{-1}$) no rio Itapecuru está consoante com o encontrado por Moreira (2008), em manancial da Região Metropolitana de Belo Horizonte.

Em seu artigo de revisão, Luo et al. (2014) relatam que trabalhos publicados no período de 2008 a 2013 apontaram a ocorrência de E2 e EE2 em água superficial natural apenas na China e na Coreia, mesmo embora trabalhos de países como Canadá, Costa Rica, França, Alemanha, Grécia, Espanha, Taiwan, Reino Unido e EUA tenham feito parte da pesquisa. A maior concentração para E2 foi $10,1 \text{ ng.L}^{-1}$, encontrada em um rio na Coreia do Sul, valor este não muito inferior ao encontrado na presente pesquisa.

Embora Esteban et al. (2014) não tenham detectado E2 e EE2 nos rios Manzanares e

Jarama, ambos da região central da Espanha, estes autores relatam que, na última década, naquele mesmo país, outros rios apresentaram concentrações que chegaram a 130 ng.L⁻¹ de E2 e a 170 ng.L⁻¹ de EE2. Relatam também a ocorrência de E2 na China (7,7 ng.L⁻¹) e nos EUA (17 ng.L⁻¹) e de EE2 nos EUA (1,4 ng.L⁻¹).

A ocorrência de hormônios estrógenos em ambientes aquáticos vem sendo abordada em diferentes regiões do planeta, resultando em trabalhos onde as concentrações de E2 e EE2 são relatadas. Embora, estas substâncias tenham sido raramente detectadas, o alto potencial estrogênico de ambas as tornam os estrógenos mais monitorados no meio ambiente (ESTEBAN et al., 2014). Ainda assim, não se conhece qualquer outro trabalho que tenha detectado E2 ou EE2 em águas superficiais na região aqui estudada.

5 CONCLUSÃO

Um método analítico para determinação dos hormônios 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol em água natural foi desenvolvido empregando-se duas técnicas analíticas complementares. O preparo das amostras de água utilizou a extração em fase sólida e a detecção e quantificação foi mediante a cromatografia a líquido acoplada a detector de fluorescência.

A associação destas técnicas foi de suma importância para se chegar aos limites de detecção e de quantificação consideravelmente baixos, pois se conseguiu um fator de concentração (Fc) igual a 4000 vezes. Assim, o método demonstrou ser capaz de quantificar os analitos em nível de poucas dezenas de ng.L^{-1} .

Os resultados da validação demonstraram que o método é seletivo, preciso e exato, com margem de confiança de 95%. O teste de robustez demonstrou que o método pode ser considerado medianamente robusto, pois variações no padrão de algumas etapas (pH da amostra, lavagem do adsorvente SPE e solvente de condicionamento e eluição) acarretaram alterações significativas na resposta analítica instrumental.

O estrógeno sintético 17α -etinilestradiol não foi detectado nas amostras analisadas. Por outro lado, verificou-se a ocorrência do hormônio natural 17β -estradiol, mesmo embora tenha ocorrido em apenas 2 (20%) das 10 amostras analisadas.

Em relação aos efeitos de indução de VTG relatados no Capítulo I, estes podem estar relacionados à concentração detectada de E2. Lu et al. (2010) relataram concentrações inferiores a 1 ng.L^{-1} de E2 na água do rio Yangtze e informou que, embora a concentração seja pequena, o alto potencial estrogênico de E2 o credencia como um dos principais causadores da indução de VTG em peixes submetidos a ensaio ecotoxicológico.

No presente estudo, não há como verificar esta correlação em função da diferença temporal entre os ensaios ecotoxicológicos e as análises químicas. Contudo, não é demais afirmar que os resultados indicam que alterações endócrinas relatadas no Capítulo I estejam, de certa forma, relacionadas com a ocorrência de 17β -estradiol no rio Itapecuru e, por conseguinte, com o lançamento in natura de esgotos sanitários na bacia hidrográfica do Itapecuru.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABREU, R. L. **Map of Maranhão state**. 2006. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Maranhao_MesoMicroMunicip.svg>. Acesso em: 06 abr. 2009.
- AERNI, H-R.; KOBLER, B.; RUTISHAUSER, B. V.; WETTSTEIN, F. E.; FISCHER, R.; GIGER, W.; HUNGERBÜHLER, A.; MARAZUELA, M. D.; PETER, A.; SCHÖNENBERGER, R.; VÖGELI, A. C.; SUTER, M. J.; EGGEN, R. I. Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 378, n. 3, p. 688-696, 2004.
- AGILENT TECHNOLOGIES. **Agilent 1200 series fluorescence detector G1321A**: Service Manual. Waldbronn: Agilent Technologies, 2006. 352 p.
- ALBANO, F. M.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T. **Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais**. Porto Alegre: Rede Metrológica RS, 2009. 136 p.
- ALCÂNTARA, E. H. Caracterização da bacia hidrográfica do rio Itapecuru, Maranhão. **Caminhos de Geografia** v. 7, n. 11, p. 97-113, 2004.
- ALDA, M. J. L.; BARCELÓ, D. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 892, p. 391-406, 2000.
- ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; DE ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciências da Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 61-72, 2007.
- ARUKWE, A.; GOKSOYR, A. Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: Oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. **Comparative Hepatology**, v. 2, 2003. Disponível em: <<http://www.comparative-hepatology.com/content/2/1/4>>. Acesso em: 24 jul. 2013.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **ABNT NBR 15499:2007**: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com peixes. Rio de Janeiro, 2007. 21 p.
- AYROZA, L. M. S. **Criação de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, em tanques-rede, na Usina Hidrelétrica de Chavantes, Rio Paranapanema, SP/PR**. 2009. 92 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, Jaboticabal, 2009.
- BACIA DO RIO ITAPECURU. Disponível em: <http://photos1.blogger.com/x/blogger/1916/4284/1600/837656/logo_itapecuru_mapa1.gif>. Acesso em: 26 jul. 2014.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.

BING MAPS. 2014. Disponível em: <<http://binged.it/1rI1aA3>>. Acesso em: 26 jul. 2014.

BIOSENSE LABORATORIES. **Semi-quantitative biomarkers ELISA kit components for fish samples**: prod. no.: B00400402 / B00400404. Bergen, Norway: Biosense Laboratories AS, 2006. 14 p.

BIOSENSE LABORATORIES. **Zebrafish vitellogenin ELISA kit**: prod. no. V01008402. Bergen, Norway: Biosense Laboratories AS, 2005. 16 p.

BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. **Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment process**. London: CRC, 2003. 312 p.

BOWMAN, J. C.; READMAN, J. W.; ZHOU, J. L. sorption of the natural endocrine disruptors, oestrone and 17 β -oestradiol in the aquatic environment. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 25, n. 1, p. 63-67, 2003.

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

CAMEL, V. Solid phase extraction of trace elements. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 58, p. 1177-1233, 2003.

CARSON, R. **Silent spring**. 1962. Disponível em: <http://library.uniteddiversity.coop/More_Books_and_Reports/Silent_Spring-Rachel_Carson-1962.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2013.

CÉSAR, I. C.; PIANETTI, G. A. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 2, p. 235-240, 2009.

COLBORN, T.; DUMANOSKI, D.; MYERS, J. P. **Our stolen future**. 1996. Disponível em: <<http://www.desireerover.nl/wp-content/uploads/OUR-STOLEN-FUTURE-Theo-Colborn.pdf>>. Acesso em: 22 dez. 2013.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (COBEA). **Princípios éticos na experimentação animal**. 1991. Disponível em: <<http://www2.ufersa.edu.br/portal/view/uploads/setores/218/PRINC%20C3%8DPIOS%20C3%89TICOS%20NA%20EXPERIMENTA%20C3%87%20ANIMAL.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2013.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (CEC). **Community strategy for endocrine disrupters**: a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. Communication from the commission to the council and the European parliament, Brussels, COM (1999) 706 final. 1999. 31 p. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:1999:0706:FIN:EN:PDF>>. Acesso em: 15 fev. 2014.

COMPANHIA DE DESENVOLVIMENTO DOS VALES DO SÃO FRANCISCO E DO PARNAÍBA (CODEVASF). **Vale do Itapecuru**: caracterização da Bacia. 2012. Disponível em: <<http://www2.codevasf.gov.br/osvales/bacia-do-itapecuru/caracterizacao-da-bacia>>. Acesso em: 27 jul. 2014.

D'AGOSTINHO, A.; FLUES, M. Determinação do coeficiente de distribuição (K_d) de benzo(α)pireno em solo por isotermas de sorção. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 657-661, 2006

DOLAN, J.W. **Why do peaks tail?**. Chester: LC•GC Europe, 2003. Disponível em: <<http://www.chromatographyonline.com/lcgc/data/articlestandard//lcgceurope/382003/69793/article.pdf>>. Acesso em: 01 abr. 2014.

ESTEBAN, S.; GORGA, M.; PETROVIC, M.; GONZÁLEZ-ALONSO, S.; BARCELÓ, D.; VALCÁRCEL, Y. Analysis and occurrence of endocrine-disrupting compounds and estrogenic activity in the surface waters of Central Spain. **Science of the Total Environment**, v. 466-467, p. 939-951, 2014.

GEHRING, P. A. F.; SANTOS, O. M. M.; PEREIRA, G. R.; ARAÚJO, M. B.; BONFILIO, R. Estabelecimento de condições para ensaio de dissolução de cápsulas de cinarizina empregando planejamento fatorial. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 455-461, 2011.

GEORGETTI, M. S. **Avaliação química e ecotoxicológica de efluentes químicos, visando seu reuso**. 2010. 168 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Urbana) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

GEYER, H. J.; RIMKUS, G. G.; SCHEUNERT, I.; KAUNE, A.; SCHRAMM, K-W.; KETTRUP, A.; ZEEMAN, M.; MUIR, D. C. G.; HANSEN, L. G.; MACKAY, D. Bioaccumulation and occurrence of endocrine-disrupting chemicals (EDCs), persistent organic pollutants (POPs), and other organic compounds in fish and other organisms including humans. In: BEEK, B. (Ed.). **The handbook of environmental chemistry**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2000. v. 2.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 695-706, 2007.

GOMES, R. C.; CARVALHO, R. R.; MORAIS, F. M.; OLIVEIRA, M. R. A. Sustentabilidade: um estudo de caso sobre a situação do Rio Itapecuru com os alunos do Curso Técnico em Meio Ambiente do Instituto Federal do Maranhão – Campus Codó. In: Simpósio de Tecnologia em Meio Ambiente e Recursos Hídricos, 4., 2012, Jahu. **Anais...** São Carlos: RiMa, 2012.

GOOGLE MAPS. 2014. Disponível em: <<http://maps.google.com.br/maps?ndsp=18&hl=pt-BR&um=1&q=s%C3%A3o%20lu%C3%ADs&ie=UTF-8&sa=N&tab=il>>. Acesso em: 12 mar. 2014.

GORDON, D.; TOTH, G. P.; GRAHAM, D. W.; LAZORCHAK, J. M.; REDDY, T. V.; KNAPP, C. W.; DE NOYELLES JR., F.; CAMPBELL, S.; LATTIER, D. L. Effects of eutrophication on vitellogenin gene expression in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to 17 α -ethynylestradiol in field mesocosms. **Environmental Pollution**, v. 142, n. 3, p. 559–566, 2006.

GREENBERG, A. E.; EATON, A. D. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21st ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2005. Seção 2, p. 37.

GREENSPAN, F. S.; GARDNER, D. G. **Basic and clinical endocrinology**. 7. ed. New York: McGraw-Hill, 2004. 976 p.

GUIMARÃES, J. R. P. F. **Disruptores endócrinos no meio ambiente**: um problema de saúde pública e ocupacional. 2005. Disponível em: <http://www.acpo.org.br/biblioteca/01_artigos_dissertacoes_teses_manuais/artigos/joao_roberto.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2013.

GUTENDORF, B.; WESTENDORF, J. Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. **Toxicology**, v. 166, p. 79-89, 2001.

HINCK, J. E.; SCHMITT, C. J.; BLAZER, V. S.; DENSLOW, N. D.; BARTISH, T. M.; ANDERSON, P. J.; COYLE, J. J.; DETHLOFF, G. M.; TILLITT, D. E. Environmental contaminants and biomarker responses in fish from the Columbia River and its tributaries: Spatial and temporal trends. **Science of the Total Environment**, v. 366, p. 549-578, 2006.

HORNUNG, M. W.; JENSEN, K. M.; KORTE, J. J.; KAHL, M. D.; DURHAN, E. J.; DENNY, J. S.; HENRY, T. R.; ANKLEY, G. T. Mechanistic basis for estrogenic effects in fathead minnow (*Pimephales promelas*) following exposure to the androgen 17 α -methyltestosterone: conversion of 17 α -methyltestosterone to 17 α -methylestradiol. **Aquatic Toxicology**, v. 66, p. 15-23, 2004.

HURWITZ, A. R.; LIU, S. T. Determination of aqueous solubility and pKa values of estrogens. **Journal of Pharmaceutical Science**. v. 66, p. 624-627, 1977.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Atlas de saneamento 2011**. Rio de Janeiro: Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/atlas_saneamento/default_zip.shtm>. Acesso em: 22 dez. 2013.

_____. **Histórico**: Bacabeira. 2013. Disponível em: <<http://cod.ibge.gov.br/46V2>>. Acesso em: 14 dez. 2013.

KANG, I.J.; YOKOTA, H.; OSHIMA, Y.; TSURUDA, Y.; YAMAGUCHI, T.; MAEDA, M.; IMADA, N.; TADOKORO, H.; HONJO, T. Effect of 17 β -Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). **Chemosphere**. v. 47, p. 71-80, 2002.

KOGER, C.S.; THE, S.J.; HINTON, D.E. Determining the sensitive developmental stages of intersex induction in Medaka (*Oryzias Latipes*) exposed to 17 β -Estradiol or Testosterone. **Marine Environmental Research**. v. 50, p. 201-206, 2000.

LAI, K. M.; JOHNSON, K. L.; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J. N. Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems. **Environmental Science & Technology**, v. 34, n. 18, p. 3890-3894, 2000.

LANGE, A.; KATSU, Y.; MIYAGAWA, S.; OGINO, Y.; URUSHITANI, H.; KOBAYASHI, T.; HIRAI, T.; SHEARS, J. A.; NAGAE, M.; YAMAMOTO, J.; OHNISHI, Y.; OKA, T.; TATARAZAKO, N.; OHTA, Y.; TYLER, C. R.; IGUCHI, T. Comparative responsiveness to natural and synthetic estrogens of fish species commonly used in the laboratory and field monitoring. **Aquatic Toxicology**, v. 109, p. 250-258, 2012.

LANGSTON, W. J.; BURT, G. R.; CHESMAN, B. S.; VANE, C. H. Partitioning, bioavailability and effects of oestrogens and xeno-oestrogens in the aquatic environment. **Journal of Marine Biology Association of U.K.**, v. 85, p. 1-31, 2005.

LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZEL, A. Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, n. 5, p. 631–681, 2003.

LIVINGSTONE, D.R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 120(A), p. 43-49, 1998.

LOBATO, F. **Informe da sub-região América do Sul**. Fórum de Águas das Américas. 2008. Disponível em: <http://arquivos.ana.gov.br/wfa/sa/WWF_South_American_Doc_finalversion_Portuguese.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2008.

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

LOPES, L. G.; MARCHI, M. R. R.; SOUZA, J. B. G.; MOURA, J. A.; LORENZON, C. S.; CRUZ, C.; AMARAL, L. A. Estrogênios em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal – São Paulo. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 639-643, 2010.

LU, G. H.; SONG, W. T.; WANG, C.; YAN, Z. H. Assessment of in vivo estrogenic response and the identification of environmental estrogens in the Yangtze River (Nanjing section). **Chemosphere**, v. 80, p. 982-990, 2010.

LUO, Y.; GUO, W.; NGO, H. H.; NGHIEM, L. D.; HAI, F. I.; ZHANG, J.; LIANG, S.; WANG, X. C. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v. 473-474, p. 619-641, 2014.

MAKINO, L. C.; NAKAGHI, L. S. O.; PAES, M. do C. F.; MALHEIROS, E. B.; DIAS-KOBERSTEIN, T. C. R. Efetividade de métodos de identificação sexual em tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) revertidas sexualmente com hormônio em ração com diferentes granulometrias. **Bioscience Journal**, v. 25, n. 2, p. 112-121, 2009.

MCGOVERN, P.; MCDONALD, H.S. Endocrine disrupters. **Water Environment and Technology**, v. 15, n. 1, p. 35-39, 2003.

MILLS, L. J.; CHICHESTER, C. Review of evidence: are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish population?. **Science of the Total Environment**, v. 343, n. 1/3, p. 1-34, 2005.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, SECRETARIA DE RECURSOS HÍDRICOS. **Caderno da região hidrográfica Atlântico Nordeste Ocidental**. Brasília: MMA, 2006a. 128 p.

_____. **Plano nacional de recursos hídricos: panorama e estado dos recursos hídricos do Brasil**. Brasília: MMA, 2006b. v. 1.

MMT PLANEJAMENTO E CONSULTORIA. **Programa de recuperação ambiental e melhoria da qualidade de vida da bacia do Bacanga: avaliação ambiental regional**. 2007. Disponível em: <<http://www.saoluis.ma.gov.br/documentos/Resumo%20executivo%20Junho%20v01.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2008.

MOREIRA, D. S. **Desenvolvimento da metodologia analítica por cromatografia/espectrometria de massas para avaliação da ocorrência de perturbadores endócrinos em mananciais de abastecimento da Região Metropolitana de Belo Horizonte**. 2008. 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2008.

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

NOGUEIRA, J. M. F. Desreguladores endócrinos: efeitos adversos e estratégias para monitorização dos sistemas aquáticos. **Química (Boletim da Sociedade Portuguesa de Química)**, n. 88, p. 65-71, 2003.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD guideline for the testing of chemicals**. 21-day fish assay: a short-term screening for oestrogenic and androgenic activity, and aromatase inhibition. 2009. Disponível em: <<http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9723001e.pdf?expires=1392560866&id=id&accname=guest&checksum=2F972CA167C81A433AAF83B8EFFD5832>>. Acesso em: 5 fev. 2014.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD series on testing and assessment number 47**. Detailed review paper on fish screening assays for the detection of endocrine active substances. Paris, 2004. Disponível em: <http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvac/oecd_fish_drp.pdf>. Acesso em: 9 fev. 2014.

PANTER, G. H.; THOMPSON, R. S.; BERESFORD, N.; SUMPTER, J. P. Transformation of a non-oestrogenic metabolite to an oestrogenically active substance by minimal bacterial activity. **Chemosphere**, v. 38, n. 15, p. 3579-3596, 1999.

POVH, A. J.; MOREIRA, H. L. M.; RIBEIRO, R. P.; PRIOLI, A. J.; VARGAS, L.; BLANCK, D. V.; GASPARINO, E.; STREIT JR, D. P. Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 27, n. 1, p. 1-10, 2005. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=303126411001>>. Acesso em: 9 fev. 2014.

PROGRAMA DE PLANEJAMENTO E GESTÃO TERRITORIAL. **Bacias hidrográficas**. 2006. Disponível em: <<http://www.ppgt.ma.gov.br/pagina.php?IdPagina=108>>. Acesso em: 10 dez. 2008.

RAKOCY, J. E. **Cultured aquatic species information programme - *Oreochromis niloticus***. Cultured Aquatic Species Information Programme. In: FAO FISHERIES AND AQUACULTURE DEPARTMENT. Roma, 2005. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en>. Acesso em: 9 fev. 2014.

REIS FILHO, R. W.; ARAÚJO, J. C.; VIEIRA, E. M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 817-822, 2006.

REIS FILHO, R. W.; ARAÚJO, J. C.; VIEIRA, E. M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 817-822, 2006.

- REMPEL, M. A.; REYES, J.; STEINERT, S.; HWANG, W.; ARMSTRONG, J.; SAKAMOTO, K.; KELLEY, K.; SCHLENK, D. Evaluation of relationships between reproductive metrics, gender and vitellogenin expression in demersal flatfish collected near the municipal wastewater outfall of Orange County, California, USA. **Aquatic Toxicology**. v. 77, p. 241-249, 2006.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; DA SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.
- RODGER-GRAY, T. P.; JOBLING, S.; KELLY, C.; MORRIS, S.; BRIGHTY, G.; WALDOCK, M. J.; SUMPTER, J. P.; TYLER, C. R. Exposure of juvenile roach (*Rutilus rutilus*) to treated sewage effluent induces dose-dependent and persistent disruption in gonadal duct development. **Environmental Science Technology**. v. 35, n. 3, p. 462-470, 2001.
- ROSE, J.; HOLBECH, H.; LINDHOLST, C.; NØRUM, U. POVLSEN, A.; KORSGAARD, B.; BJERREGAARD, P. Vitellogenin induction by 17 β -estradiol and 17 α -ethiylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 131, p. 531-539, 2002.
- ROZENFELD, S. Terapia hormonal para a menopausa (TH): múltiplos interesses a considerar. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 2, p. 437-442, 2007.
- SANCHEZ, D. C. O. **Desreguladores endócrinos na indução da vitelogenina em peixes nativos**. 2006. 71 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- SECRETARIA NACIONAL DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: diagnóstico dos serviços de água e esgotos** – 2011. Brasília: Ministério das Cidades. SNSA, 2013. 432 p.
- SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.
- SILVA, J. R.; SILVA, L. T.; DRUZIAN, J. I. Otimização e validação intralaboratorial de método para análise de resíduos de cloranfenicol em leite caprino por cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (CG/DCE). **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 90-96, 2010.
- SILVA, R. N. M.; RODRIGUES, E. E.; LEITE, I. M.; MENDES, J. L. P.; FERNANDES, J. R. R. Oferta e demanda de água na ilha de São Luís. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 23., 2005, Campo Grande. **Livro de resumos...** Mato Grosso do Sul: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2005a. Disponível em: <<http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/abes23/IV-003.pdf>>. Acesso em: 26 nov. 2008.

_____. Percepção ambiental do rio Itapecuru, nas cidades de Pirapemas, Cantanhêde, Itapecuru Mirim, Bacabeira, Santa Rita e Rosário. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 23., 2005, Campo Grande. **Livro de resumos...** Mato Grosso do Sul: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2005b. Disponível em: <<http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/abes23/VI-007.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2008.

SILVEIRA, T. R.; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 2, 2012. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252012000200002&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 9 fev. 2014.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. Tradução da 8ª edição norte-americana. São Paulo: Thomson, 2006. 1124 p.

SOLID PHASE EXTRACTION: Application guide. Macherey-Nagel. Disponível em: <ftp://ftp.mn-net.com/english/Flyer_Catalogs/Chromatography/SPE/SPE_Applis.pdf>. Acesso em: 04 jul. 2014.

SUMPTER, J. P.; JOHNSON, A. C. Lessons learned from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environment. **Environmental Science Technology**, v. 39, p. 4321-4332, 2005.

TOMŠÍKOVÁ, H.; AUFARTOVÁ, J.; SOLICH, P.; SOSA-FERRERA, Z.; JOSÉ JUAN SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J.; NOVÁKOVA, L. High-sensitivity analysis of female-steroid hormones in environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 34, p. 35-58, 2012.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP)**. 2013. Disponível em: <<http://www.epa.gov/endo/index.htm>>. Acesso em: 22 dez. 2013.

VAN DEN BELT, K.; VERHEYEN, R.; WITTERS, H. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, p. 271-281, 2003.

VANDERFORD, B. J.; PEARSON, R. A.; REXING, D. J.; SNYDER, S. A. Analysis of endocrine disruptors, pharmaceuticals, and personal care products in water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 6265-6274, 2003.

VEGA-MORALES, T.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J. Determination of alkylphenol polyethoxylates, bisphenol-A, 17 α -ethynylestradiol and 17 β -estradiol and its metabolites in sewage samples by SPE and LC/MS/MS. **Journal of Hazardous Materials**, v. 183, p. 701-711, 2010.

VERBINNEN, R. T.; NUNES, G. S.; VIEIRA, E. M. Determinação de hormônios estrógenos em água potável usando CLAE-DAD. **Química Nova**, v. 33, p. 1837-1842, 2010.

WISMAN, P. **EPA history (1970-1985)**. EPA, 1985. Disponível em: <<http://www2.epa.gov/aboutepa/epa-history-1970-1985>>. Acesso em: 22 dez. 2013.

YE, A.; YANG, Y.; ZHANG, J.; LIU, M.; HOU, L.; ZHOU, J. L. Simultaneous determination of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in fish by ultra-high-performance liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1278, p. 126-132, 2013.

YING, G-G.; KOOKANA, R. S.; RU, Y-J. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. **Environment International**, n. 28, p. 545-551, 2002.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 2^a. ed. São Carlos: Ed. Rima, 2008. 486 p.

ZALA, S. **Zebrafish**. Áustria: Universidade de Medicina Veterinária de Viena. 2012. Disponível em: <http://www.vetmeduni.ac.at/fileadmin/v/z/presseinformation/2012/Zebrafische_c_VetmeduniVienna_Zala_03.jpg>. Acesso em: 9 fev. 2014.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice Hall, 1984. 718 p.

APÊNDICE 1 - Dados dos processos dos Testes de Normalidade Shapiro-Wilk ($P=0,05$) para *Danio rerio*, por meio do suplemento Action[®] (versão 2.5.197.344, Estatcamp, Brasil) para Excel.

Macho, período de chuva, grupo 0	MC0	Macho, período de chuva, grupo 50	MC50
Estatística: Shapiro-Wilk	0,365720721	Estatística: Shapiro-Wilk	0,604570055
P-valor	1,00369E-07	P-valor	2,89813E-05
Normal?	Não	Normal?	Não

Macho, período de chuva, grupo 100	MC100	Macho, período de estiagem, grupo 0	ME0
Estatística: Shapiro-Wilk	0,654541	Estatística: Shapiro-Wilk	0,718766
P-valor	0,000249	P-valor	0,001488
Normal?	Não	Normal?	Não

(continua)

(continuação)

Macho, período de estiagem, grupo 50	ME50	Macho, período de estiagem, grupo 100	ME100
Estatística: Shapiro-Wilk	0,365720721	Estatística: Shapiro-Wilk	0,604570055
P-valor	1,00369E-07	P-valor	2,89813E-05
Normal?	Não	Normal?	Não

Fêmea, período de chuva, grupo 0	FC0	Fêmea, período de chuva, grupo 50	FC50
Estatística: Shapiro-Wilk	0,829948649	Estatística: Shapiro-Wilk	0,781476338
P-valor	0,023309378	P-valor	0,005813056
Normal?	Não	Normal?	Não

(continua)

(continuação)

Fêmea, período de chuva, grupo 100 FC100
Estatística: Shapiro-Wilk 0,937518
P-valor 0,491779
Normal? Sim

Fêmea, período de estiagem, grupo 0 FE0
Estatística: Shapiro-Wilk 0,740041
P-valor 0,002699
Normal? Não

Fêmea, período de estiagem, grupo 50 FE50
Estatística: Shapiro-Wilk 0,528833
P-valor 7,93E-06
Normal? Sim

Fêmea, período de estiagem, grupo 100 FE100
Estatística: Shapiro-Wilk 0,344991
P-valor 2,24E-08
Normal? Não

APÊNDICE 2 - Dados dos processos dos Testes de Homocedasticidade Levene ($P=0,05$) para *Danio rerio*, por meio do suplemento Action® (versão 2.5.197.344, Estatcamp, Brasil) para Excel. (continua)

DADOS DO PROCESSO

Macho, período de chuva

<i>Informação</i>	<i>Valor</i>
Levene (estatística do teste)	0,932552566
Graus de Liberdade	2
P-valor	0,405429894

Não normal.
Homogêneo?
SIM

<i>Intervalos de Confiança para o Desvio-padrão</i>			
<i>Fator</i>	<i>Limite Inferior</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Limite Superior</i>
MC0	7,02329538	11,37045054	25,89748477
MC100	6,041005838	9,780160794	22,27542033
MC50	0,72325407	1,147860937	2,472175817

DADOS DO PROCESSO

Macho, período de estiagem

<i>Informação</i>	<i>Valor</i>
Levene (estatística do teste)	0,290878442
Graus de Liberdade	2
P-valor	0,749919789

Somente grupo 50 normal.
Homogêneo?
SIM

<i>Intervalos de Confiança para o Desvio-padrão</i>			
<i>Fator</i>	<i>Limite Inferior</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Limite Superior</i>
ME0	0,670137632	1,084927572	2,471045028
ME100	2,940980058	4,87206823	11,88480306
ME50	0,736328974	1,168611835	2,516867527

DADOS DO PROCESSO

Fêmea, período de chuva

<i>Informação</i>	<i>Valor</i>
Levene (estatística do teste)	0,980423531
Graus de Liberdade	2
P-valor	0,386484081

Somente grupo 100 normal.
Homogêneo?
SIM

<i>Intervalos de Confiança para o Desvio-padrão</i>			
<i>Fator</i>	<i>Limite Inferior</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Limite Superior</i>
FC0	2050,62516	3254,502969	7009,301628
FC100	1468,579461	2330,750792	5019,79426
FC50	1205,578246	1880,254096	3865,069364

DADOS DO PROCESSO

Fêmea, período de estiagem

<i>Informação</i>	<i>Valor</i>
Levene (estatística do teste)	1,442195157
Graus de Liberdade	2
P-valor	0,253434646

Não normal.
Homogêneo?
SIM

<i>Intervalos de Confiança para o Desvio-padrão</i>			
<i>Fator</i>	<i>Limite Inferior</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Limite Superior</i>
FE0	685,6033302	1109,965954	2528,072769
FE100	92,96406682	147,5412656	317,7631863
FE50	955,3600262	1546,691879	3522,765367

APÊNDICE 3 - Dados dos processos dos Testes de Normalidade Shapiro-Wilk ($P=0,05$) para *Oreochromis niloticus*, por meio do suplemento Action[®] (versão 2.5.197.344, Estatcamp, Brasil) para Excel.

Macho, período de chuva, grupo 0	MC0	Macho, período de chuva, grupo 50	MC100
Estatística: Shapiro-Wilk	0,955429546	Estatística: Shapiro-Wilk	0,906797
P-valor	0,717147384	P-valor	0,07556
Normal?	Sim	Normal?	Sim
Macho, período de estiagem, grupo 0	ME0	Macho, período de estiagem, grupo 100	ME100
Estatística: Shapiro-Wilk	0,931955	Estatística: Shapiro-Wilk	0,809373
P-valor	0,534042	P-valor	0,071249
Normal?	Sim	Normal?	Sim
Fêmea, período de chuva, grupo 0	FC0	Fêmea, período de estiagem, grupo 0	FE0
Estatística: Shapiro-Wilk	0,893716705	Estatística: Shapiro-Wilk	0,781476338
P-valor	0,25331092	P-valor	0,005813056
Normal?	Sim	Normal?	Sim

ANEXO A - Climatologia (temperatura mínima, temperatura máxima e precipitação) no município de Bacaneira, MA.

Os dados apresentados representam o comportamento da chuva e da temperatura ao longo do ano. As médias climatológicas são valores calculados a partir de uma série de dados de 30 anos observados. É possível identificar as épocas mais chuvosas/secas e quentes/frias de uma região.

Fonte: INMET/CFS/Interpolação

Disponível em: <<http://www.climatempo.com.br/climatologia/5928/bacabeira-ma>>. Acesso em: 15 ago 2014.