AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ESTROGÊNICA E DE INTERFERENTES ENDÓCRINOS EM
ÁGUAS SUPERFICIAIS DO ESTADO DE SÃO PAULO**

GISELA DE ASSIS MARTINI

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

**Orientador:
Prof. Dr. José Roberto Rogero**

**São Paulo
2018**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ESTROGÊNICA E DE INTERFERENTES ENDÓCRINOS EM
ÁGUAS SUPERFICIAIS DO ESTADO DE SÃO PAULO**

GISELA DE ASSIS MARTINI

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

Orientador:
Prof. Dr. José Roberto Rogero

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2018

*Dedico esta tese aos meus pais, todo
o meu amor e gratidão!*

Agradecimentos

A jornada do meu doutorado não teria sido possível sem a ajuda de muitas pessoas. Agradeço à minha família, principalmente aos meus pais Waldomiro e Elisabete por todo o apoio, suporte e por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos, vocês são a minha referência, amo vocês! Ao meu amado marido Rodrigo, que me incentivou, apoiou, torceu, e dividiu todo o seu tempo livre para me ouvir e principalmente para me motivar até o final do doutorado. Eu te amo, e muito obrigada por toda a sua paciência, ajuda e carinho! Agradeço as minhas irmãs Laura e Júlia, por todos os momentos de descontração, apoio e incentivo, amo vocês!

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. José Roberto Rogero por todo o apoio, encorajamento, amizade e orientação durante todo o meu trajeto na pós-graduação. Ao Prof. Dr. Gilson Alves Quinágua, pela colaboração e oportunidade de desenvolver este trabalho em parceria com o Setor de Análises Toxicológicas na CETESB. Serei eternamente grata a vocês; a dedicação pela ciência que compartilharam comigo será de grande valia por toda a minha vida.

Agradeço a todos que contribuíram e ajudaram no meu doutorado, em especial à Sizue, Daniela, Wallace e William por toda a colaboração nas atividades científicas nesses quatro anos. Aos meus queridos amigos do Laboratório de Ecotoxicologia do CQMA-IPEN e da CETESB, muito obrigada pelo incentivo, amizade e torcida!

Aos pesquisadores que colaboraram com este projeto. Em especial à Profa. Dra. Cassiana Montagner que realizou as análises químicas, e com quem eu aprendi muito. À Dra. Mônica Lopes-Ferreira que me recebeu em seu laboratório no Instituto Butantã para realizar os ensaios com zebrafish. À Dra. Luciane Maranhão pela colaboração na realização dos ensaios com biomarcadores.

E finalmente, ao CNPq pelo apoio financeiro, ao IPEN pela oportunidade de realizar a pós-graduação e à CETESB por me dar a oportunidade de realizar este trabalho nas suas instalações.

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas”. (Carl Sagan)

RESUMO

MARTINI, G. A., *Investigação da atividade estrogênica e interferentes endócrinos em águas superficiais do Estado de São Paulo*. 2018. 128 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

Nas últimas décadas, a ocorrência de atividade estrogênica e interferentes endócrinos (IEs) no ambiente aquático têm se tornado uma crescente preocupação. Dentre as diversas substâncias classificadas como IEs, destacam-se os fármacos, produtos de higiene e cuidados pessoais, hormônios naturais e sintéticos, produtos químicos industriais, praguicidas e muitos outros compostos que atingem o ambiente aquático por meio de descargas de esgoto doméstico, industrial ou de escoamento agrícola. Os objetivos deste estudo foram determinar a atividade estrogênica em amostras de águas superficiais, e avaliar seus efeitos biológicos no desenvolvimento de embriões de *Danio rerio*, a fim de propor faixas baseadas em valores de desencadeamento de efeitos para categorizar a atividade estrogênica. As amostras ambientais também foram analisadas por cromatografia líquida acoplada com a espectrometria de massas para identificar as substâncias que são suspeitas de causar alteração endócrina. Os compostos analisados foram: praguicidas, hormônios, triclosan, bisfenol A, octilfenol, nonilfenol, e a cafeína como indicador de atividade antrópica. A atividade estrogênica foi medida pelo ensaio *Bioluminescent Yeast Estrogen* (BLYES), que fornece os resultados em equivalente de 17 β -estradiol (EEQ). No entanto, este ensaio não é capaz de prover informações sobre os efeitos adversos em organismos aquáticos. Para observação de possíveis efeitos na biota, os embriões foram expostos a amostras de águas superficiais com resultados acima de 0,1 EEQ no BLYES. Os ensaios foram realizados de acordo com a OECD No. 236 (2013), verificando efeitos agudos como: ausência de batimento cardíaco, não formação de somitos, não desprendimento da cauda, e embrião coagulado. Malformações embrionárias tais como: redução do tamanho do organismo, edema cardíaco e vitelínico, curvatura da coluna vertebral, também foram avaliadas. As informações obtidas pelo ensaio com embriões de *Danio rerio* foram adequadas para mostrar os efeitos da mistura de contaminantes em organismos não-alvo. A atividade estrogênica medida pelo BLYES ficou abaixo do limite de quantificação (0,1 EEQ) em 44,8% do total de 116 amostras analisadas, e a faixa de atividade estrogênica variou de 0,11 a 14,6 EEQ. Além disso, a presença de contaminantes mesmo que em concentrações baixas ressalta a necessidade de mais estudos para entender os efeitos dessas substâncias nos organismos aquáticos.

Palavras-chave: atividade estrogênica; interferentes endócrinos; categorização; FET; BLYES

Abstract

MARTINI, G. A., *Investigation of estrogenic activity and endocrine disrupting chemicals in surface water of São Paulo State*. 2018. 128 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

Over the last few decades, the occurrence of estrogenic activity and endocrine disrupting chemicals (EDCs) in aquatic environment has become a worldwide issue of increasing environmental concern. The EDCs have the ability to alter the endocrine system of organisms, and includes pharmaceuticals, personal care products, steroid hormones, industrial chemicals, pesticides and many other compounds. Such compounds are present in several industrial and domestic activities and reach the aquatic environment via wastewater discharges or agricultural runoff. The aim of this study was to determine the overall estrogenic activity of surface water, evaluate biological effects on fish embryos development, in order to propose concentrations range based on trigger value to categorize estrogenic activity. Environmental samples were also analyzed by liquid chromatography tandem mass spectrometry to identify substances that are suspected to be an endocrine disruptor. The analyzed compounds were: pesticides, hormones, triclosan, bisphenol A, octylphenol, nonylphenol, and caffeine as an indicative of anthropic activity. The estrogenic activity was measured by Bioluminescent Yeast Estrogen assay (BLYES), with the results expressed in *17 β -estradiol equivalent quotient (EEQ)*. However, this assay is not able to provide information about adverse effects to aquatic organisms. In order to observe effects on aquatic organisms, organic extracts of surface water with results ≥ 0.1 EEQ in BLYES were tested in a bioassay using *Danio rerio* embryos. The methodology was conducted according OECD No. 236 and verified effects such as: lack of heart beat, lack of somites formation, non-detachment tail and coagulated embryo. Embryonic malformations were also evaluated, such as: reduction of organism size, edema and spine curvature, which are chronic effects. These effects probably are associated with contaminants mixtures. The obtained information by embryonic assay with *Danio rerio* was suitable to show the effects of contaminants mixture and was used to a categorization proposal of estrogenic activity. Estrogenic activity was below the limit of quantification (0.1 EEQ) in 44.8% of 116 analyzed samples, and range of estrogenic activity was from 0.11 to 14.6 EEQ. The tested samples in FET test were analyzed for acute or chronic toxicity in *Danio rerio* embryos. Based on the obtained results, even when estrogenic activity is present in surface water, the contaminants mixture can cause toxic effects in non-target organisms. Besides this, the widespread presence of these chemicals highlight the need for further studies in order to understand the harmfulness of these contaminants to aquatic organisms.

Key words: estrogenic activity; endocrine disrupting chemicals; assortment; FET; BLYES

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplos de possíveis destinos de contaminantes no meio ambiente	19
Figura 2 – Potenciais fontes e rotas de interferente endócrinos no meio ambiente.....	23
Figura 3 – Etapas da embriogênese do <i>Danio rerio</i>	32
Figura 4 – Desenvolvimento embrionário do <i>Danio rerio</i>	33
Figura 5 – Relação do estresse ambiental com os biomarcadores.....	35
Figura 6 – Consequências ecológicas devido à exposição aos contaminantes.....	36
Figura 7 – Mapa da localização dos pontos de amostragem em 2015 e 2016.....	38
Figura 8 – ^(a) Extração em fase sólida (SPE); ^(b) Concentrador de amostras	41
Figura 9 – Esquema do bioensaio BLYES	42
Figura 10 – Efeitos agudos avaliados no FET teste ^(a) Ovo coagulado; ^(b) Embrião em formação (ausência de batimentos cardíacos)	50
Figura 11 – Efeitos sub-letais avaliados no FET teste ^(a) Organismo com tamanho reduzido, curvatura e edema; ^(b) Organismo com tamanho reduzido; ^(c) Organismo com curvatura; ^(d) Organismo com formação de edema cardíaco e vitelínico.....	51
Figura 12 – ^(a) Organismo normal, ^(b) Organismo normal não eclodido, ^(c) Organismo normal recém eclodido	51
Figura 13 – Fluxograma das etapas realizadas	54
Figura 14 – Etapas de avaliação de amostras ambientais quanto à estrogenicidade e citotoxicidade	56
Figura 15 – Distribuição dos valores da atividade estrogênica (ng eq E2 L ⁻¹) de acordo com os locais estudados em 2015 e 2016	58
Figura 16 – Efeitos observados nos embriões de <i>Danio rerio</i> após exposição às amostras de água superficial dos rios estudados acordo com os locais de amostragem durante 2015 e 2016	61
Figura 17 - Efeitos observados nos embriões de <i>Danio rerio</i> após exposição às amostras de água superficial dos rios estudados acordo com os locais de amostragem durante 2015 e 2016	65
Figura 18 – Taxa de alterações morfológicas (%) no FET em comparação com atividade estrogênica medida no BLYES	66
Figura 19 – Taxa de letalidade (%) no FET	67
Figura 20 - Resultados dos danos ao DNA medidos em embriões de zebrafish após exposição às amostras de 2015.....	68
Figura 21 - Resultados dos danos ao DNA medidos em embriões de zebrafish após exposição às amostras de 2016	69
Na Figura 22 estão apresentados os resultados das análises de peroxidação lipídica em embriões de zebrafish após 96h de exposição às amostras de água superficial. Das amostras analisadas, as	

que apresentaram peroxidação lipídica medida mais altas foram o rio Araras (abril, 2015), Ribeirão Grande (março, 2016) e o rio Piracicaba (julho, 2016).....	70
Figura 23 – Concentração dos compostos quantificados em escala logarítmica nas amostras de água superficial de acordo com os locais amostrados.....	84
Figura 24 – Concentração dos compostos quantificados por classes de substâncias em escala logarítmica nas amostras de água superficial analisadas durante 2015 e 2016.....	89
Figura 25 – Escala dos efeitos observados em vertebrados aquáticos após exposição ao BPA..	96
Figura 26 – Distribuição das amostras, padrão de E2 e controles.....	129
Figura 27 - Carta controle com ZnCl ₂ em embriões de <i>Danio rerio</i>	129
Figura 28 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES com 17 β -estradiol e Branco referente à 2015	135
Figura 29 - Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do reservatório Guarapiranga referente à 2015	135
Figura 30 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do Ribeirão Pires referente à 2015	136
Figura 31 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do rio Piracicaba referente à 2015.....	136
Figura 32 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do rio Jaguari referente à 2015.....	137
Figura 33 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do Ribeirão Grande referente à 2015	137
Figura 34 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do reservatório Jaguari referente à 2015	138
Figura 35 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do reservatório Cascata referente à 2015	138
Figura 36 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do rio Araras referente à 2015.....	139
Figura 37 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do rio Sapucaí-Guaçu referente à 2015	139
Figura 38 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do rio São Miguel Arcanjo referente à 2015	140
Figura 39 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES com 17 β -estradiol e Branco referente à 2016.....	140
Figura 40 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do reservatório Guarapiranga referente à 2016.....	141
Figura 41 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do Ribeirão Pires referente à 2016.....	141

Figura 42 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do rio Piracicaba referente à 2016.....	142
Figura 43 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do rio Jaguari referente à 2016.....	142
Figura 44 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do Ribeirão Grande referente à 2016	143
Figura 45 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do reservatório Jaguari referente à 2016	143
Figura 46 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do reservatório Cascata referente à 2016	144
Figura 47 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do rio Araras referente à 2016.....	144
Figura 48 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do rio Sapucaí-Guaçu referente à 2016.....	145
Figura 49 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do rio São Miguel Arcanjo referente à 2016.....	145

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Informações dos locais de amostragem (DAEE, 2017).....	39
Tabela 2 – Parâmetros instrumentais de cada composto para LC-MS/MS	45
Tabela 3 – Resultados do BLYES (ng eq E2 L ⁻¹) de acordo com as coletas bimestrais para os anos de 2015 e 2016.....	57
Tabela 4 - Equivalentes estrogênicos seguros em relação aos estrogênios esteróides (EEQ-SSE) calculados para diferentes bioensaios <i>in vitro</i> em estações de tratamento de efluentes domésticos e rios próximos às suas descargas	74
Tabela 5 – Resultados do BLYES (EEQ) apresentados de acordo com a categorização baseada no EBT derivado para estrogenicidade	79
Tabela 6 – Faixa de concentração (ng L ⁻¹), ocorrência dos compostos nos locais amostrados (%), e frequência (%) dos compostos quantificados em amostras de águas superficiais do Estado de São Paulo utilizando LC-MS/MS em 2015 e 2016	82
Tabela 7 – Concentrações dos praguicidas que foram detectados em mais de 30% no total de amostras analisadas no presente estudo, e concentrações encontradas em águas superficiais em outros trabalhos disponíveis na literatura.....	93
Tabela 8 – Recuperação em quatro diferentes concentrações do 17 β -estradiol.....	126
Tabela 9 – Preparo do Meio Mínimo (YMM).....	127
Tabela 10– Formulação da solução de vitaminas.....	128
Tabela 11 – Meio de crescimento das leveduras (YMMG)	128
Tabela 12 – Resultados da mortalidade (%) dos organismos expostos à DCA.....	130
Tabela 13 - Substâncias quantificadas por LC-MS/MS em amostras referentes ao Reservatório Cascata	148
Tabela 14 - Substâncias quantificadas por LC-MS/MS em amostras referentes ao Reservatório Guarapiranga	149
Tabela 15 - Substâncias quantificadas por LC-MS/MS em amostras referentes ao Reservatório Jaguari	150
Tabela 16 - Substâncias quantificadas por LC-MS/MS em amostras referentes ao Ribeirão Grande	151
Tabela 17 - Substâncias quantificadas por LC-MS/MS em amostras referentes ao Ribeirão Pires	152
Tabela 18 - Substâncias quantificadas por LC-MS/MS em amostras referentes ao Rio Araras	153
Tabela 19 - Substâncias quantificadas por LC-MS/MS em amostras referentes ao Rio Jaguari	154

Tabela 20 - Substâncias quantificadas por LC-MS/MS em amostras referentes ao Rio Piracicaba	155
Tabela 21 - Substâncias quantificadas por LC-MS/MS em amostras referentes ao Rio São Miguel Arcanjo	156
Tabela 22 - Substâncias quantificadas por LC-MS/MS em amostras referentes ao Rio Sapucaí-Guaçu	157
Tabela 23 – Dados brutos FET Rio Araras	158
Tabela 24 - Dados brutos FET Ribeirão Pires.....	159
Tabela 25 - Dados brutos FET Reservatório Cascata.....	160
Tabela 26 - Dados brutos FET Rio Jaguari	160
Tabela 27 - Dados brutos FET Rio Piracicaba.....	161
Tabela 28 - Dados brutos FET Ribeirão Grande.....	162
Tabela 29 - Dados brutos FET Rio Sapucaí-Guaçu	163
Tabela 30 - Dados brutos FET Reservatório Guarapiranga	164
Tabela 31 - Dados brutos FET Rio São Miguel Arcanjo	164

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	Objetivos específicos	17
3	REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1	Águas superficiais e legislação ambiental.....	18
3.2	Contaminantes emergentes.....	19
3.3	Interferentes endócrinos	20
3.4	Ocorrência e histórico dos interferentes endócrinos	21
3.5	Atividade estrogênica em águas superficiais	23
3.6	Caracterização química em amostras de água superficial	25
3.6.1	Hormônios.....	26
3.6.2	Praguicidas	27
3.6.3	Plastificantes: Bisfenol-A.....	28
3.6.4	Alquilfenóis: OP e NP.....	28
3.6.5	Agente antibacteriano: Triclosan	29
3.6.6	Cafeína como traçador de atividade antrópica	29
3.7	Avaliação de efeitos tóxicos em organismos não-alvo	30
3.7.1	Peixes como modelo na avaliação de efeitos tóxicos e IEs.....	30
3.7.1.1	<i>Danio rerio</i>	31
3.8	Fish Embryo Toxicity (FET) teste	33
3.9	Biomarcadores.....	34
4	METODOLOGIA	37
4.1	Locais de amostragem.....	37
4.2	Coleta de amostras	40
4.3	Preparo de amostras	40
4.4	<i>Bioluminescent Yeast Estrogen Screen</i> (BLYES).....	41
4.5	Caracterização química	43
4.5.1	Cromatografia acoplada a espectrometria de massas	43
4.6	Bioensaio <i>in vivo</i> com <i>Danio rerio</i>	50
4.7	Biomarcadores.....	52
4.7.1	Peroxidação lipídica	52
4.7.2	Danos em DNA	53
4.7.3	Quantificação de proteínas totais	53
4.7.4	Descrição das etapas realizadas.....	54

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	Atividade estrogênica em águas superficiais: BLYES.....	55
5.2	Avaliação dos efeitos <i>in vivo</i> utilizando o FET teste	60
5.3	Biomarcadores: danos no DNA e peroxidação lipídica em embriões de <i>Danio rerio</i>	68
5.4	Proposta de categorização da atividade estrogênica.....	72
5.5	Caracterização química das amostras ambientais	80
6	CONCLUSÕES	99
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
8	ANEXOS	127
8.1	Anexo I: Recuperação da SPE	127
8.2	Anexo II: BLYES.....	128
8.3	Anexo III: Ensaios de sensibilidade e controle positivo no FET	130
8.4	Anexo IV: Biomarcadores.....	131
8.4.1	Peroxidação lipídica	131
8.4.2	Danos ao DNA	132
8.4.3	Quantificação de proteínas totais	135
8.5	Anexo V: Citotoxicidade e estrogenicidade nas amostras de água superficial	135
8.6	Anexo VI: Comitê de Ética no Uso de Animais	147
9	APÊNDICES.....	149
9.1	Dados brutos análises químicas	149
9.2	Dados brutos FET	159

1 INTRODUÇÃO

A importância da qualidade da água está conceituada na Política Nacional de Recursos Hídricos, que define dentre seus objetivos: “assegurar à atual e às futuras gerações a necessária disponibilidade de água, em padrões de qualidade adequados aos respectivos usos” (BRASIL, 1997). Para cada uso da água é necessário estabelecer as exigências relativas à sua qualidade, isto é, definir parâmetros de qualidade e estabelecer valores-limite (WHO, 1997).

As atividades antropogênicas são majoritariamente responsáveis pela entrada de diversas classes de substâncias químicas no meio ambiente, seja de fonte industrial, doméstica ou de origem agrícola (AMIARD-TRIQUET *et al.*, 2012). O aporte dessas substâncias no meio ambiente se dá por diversas atividades, uma das principais é o descarte de efluentes em corpos hídricos.

Dentre as grandes preocupações do século XXI, estão as substâncias não regulamentadas, chamadas de contaminantes emergentes. Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), os contaminantes emergentes são: “poluentes (bióticos e abióticos) que, atualmente, não estão incluídos em programas de monitoramento e que podem se tornar candidatos para legislações futuras dependendo de pesquisas sobre (eco)toxicidade, efeitos sobre a saúde, percepção pelo público e dados sobre sua ocorrência em diversos compartimentos ambientais” (USEPA, 1997).

São diversas as classes de substâncias classificadas como contaminantes emergentes, onde incluem-se: praguicidas, fármacos, produtos de higiene pessoal, retardantes de chama, alquilfenóis, bifenilas policloradas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, e interferentes endócrinos, sendo esta a classe de interesse no presente estudo. De acordo com a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), substâncias endócrinas ativas são produtos químicos que podem interagir ou interferir com a atividade hormonal normal, e quando essa alteração ocasiona efeitos adversos, tais substâncias são denominadas interferentes endócrinos (EFSA, 2013; WHO/UNEP, 2013). Sendo assim, um interferente endócrino é qualquer substância ou mistura exógena que altere a função do sistema endócrino e/ou provoque efeitos adversos em um organismo saudável (IPCS, 2002).

Essas substâncias podem causar efeitos adversos à biota aquática e, se presentes em água potável, podem se tornar uma via de exposição direta aos seres humanos. Portanto, o monitoramento da água para a presença de compostos estrogênicos é importante para garantir a qualidade da saúde pública e ambiental (JONKER *et al.*, 2015).

Os interferentes endócrinos são divididos em categorias, sendo as principais:

1. Estrogênios naturais (exo.: estrona - E1; estriol - E3 e estradiol - E2),
2. Xenoestrógenos (exo.: praguicidas, bisfenol-A, HPAs, PCBs, etc),
3. Fitoestrogênios (exo.: isoflavona – folhas de amora, genisteína – grão de soja, *trans*-resveratrol – cascas de uva), e
4. Estrogênios sintéticos (exo.: etinilestradiol, dietilestilbestrol).

Dentre os hormônios, os que mais despertam interesse são: o hormônio endógeno 17 β estradiol (E2) e o fármaco contraceptivo 17- α etinilestradiol (EE2). Ambos são altamente potentes ao receptor de estrógeno α e β (ERa and ERb) e são capazes de alterar as funções hormonais da biota aquática em níveis baixos (0,1 – 10,0 ng L⁻¹) (CÉSPEDES *et al.*, 2004).

Os xenoestrógenos, fitoestrógenos e estrogénios sintéticos são substâncias com estrutura química semelhante à dos estrógenos naturais, com capacidade de ligar-se ao receptor e interferir no processo natural do hormônio (BILA e DEZOTTI, 2007). Na literatura encontram-se diversas referências aos compostos que alteram funções hormonais, como por exemplo: disruptores endócrinos e desreguladores endócrinos. No presente estudo foi adotada a nomenclatura de interferentes endócrinos (IEs).

De acordo com BIRKETT e LESTER (2003) as perturbações causadas pelos interferentes endócrinos (IEs) são: mimetização de hormônios naturais, bloqueio de sítios receptores em uma determinada célula, aceleração da síntese e excreção de hormônios, desativação de enzimas responsáveis pela secreção de hormônios, impedindo que os hormônios interajam com receptores celulares.

Diversos tipos de contaminantes, como os interferentes endócrinos, fármacos, praguicidas e substâncias genotóxicas estão presentes no ambiente aquático, nos efluentes e na água potável (SUMPTER, 2005; GUILLETTE, 2002; JOBLING, 1998; COLBORN, 1996; BIRCHENOUGH, 2002; MONTAGNER *et al.*, 2014; ALBUQUERQUE *et al.*, 2016). Estes contaminantes possuem diferentes propriedades físico-químicas, e chegam ao meio ambiente por meio de sua utilização agropecuária, industrial e/ou doméstica (JONKER *et al.*, 2015).

A identificação de interferentes endócrinos tem sido reportada em escala mundial, e a classificação destas substâncias quanto ao seu potencial de atividade estrogênica ainda não está estabelecido. Para tanto, torna-se imprescindível a avaliação da qualidade dos corpos hídricos, uma vez que as águas superficiais recebem um grande aporte de efluentes, tanto domésticos, quanto industriais.

O presente estudo investigou a presença de atividade estrogênica (AE) em 7 rios e 3 reservatórios no Estado de São Paulo, a fim de propor faixas de valores orientadores para a AE

medida por meio de um bioensaio *in vitro*. Para obter as informações necessárias para a determinação da faixa de valores orientadores, foram realizadas análises químicas em amostras ambientais para determinação de substâncias consideradas interferentes endócrinos, além de bioensaio *in vivo* e marcadores bioquímicos para avaliação dos efeitos adversos causados após exposição às amostras de água superficial.

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo a identificação e quantificação da atividade estrogênica e de substâncias classificadas como interferentes endócrinos visando a proteção da vida aquática em águas superficiais do estado de São Paulo.

2.1 Objetivos específicos

- (i) Identificar a atividade estrogênica, por meio do bioensaio *in vitro* *Bioluminescent Yeast Estrogen Screening* (BLYES) em amostras de águas superficiais;
- (ii) Caracterizar quimicamente as amostras ambientais de substâncias consideradas interferentes endócrinos, e da cafeína utilizando cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS/MS);
- (iii) Realizar o bioensaio *in vivo* *Fish Embryo Toxicity Teste* (FET) utilizando embriões de *Danio rerio*, avaliando os efeitos no desenvolvimento e letalidade após exposição as amostras de água superficial;
- (iv) Realizar análises de biomarcadores utilizando larvas de *Danio rerio* após 96h de exposição as amostras ambientais a fim de verificar o possível efeito citogenotóxico;
- (v) Propor uma categorização para a atividade estrogênica por meio dos resultados obtidos pelo BLYES, FET e biomarcadores, e comparação com os resultados disponíveis na literatura.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Águas superficiais e legislação ambiental

Considerando a importância de informações espaço-temporais e tendências a longo prazo, o conhecimento da qualidade das águas superficiais em escala global é notadamente limitado (DÖLL *et al.*, 2016).

A qualidade de um corpo hídrico reflete influências importantes, incluindo o processo geológico da bacia, condições climáticas e atividades antropogênicas. Para tanto, o monitoramento de recursos hídricos é imprescindível para melhor compreensão dos possíveis impactos antropogênicos nos corpos hídricos (HADDELAND *et al.*, 2014).

Programas de monitoramento são necessários a fim de se obter conhecimento da qualidade dos corpos hídricos e o histórico quanto à presença de poluentes; promovendo efetividade em programas para a melhoria da qualidade da água. No âmbito da legislação ambiental brasileira, em 1997 entrou em vigor no Brasil a Lei nº 9.433/1997, que instituiu a Política Nacional de Recursos Hídricos (PNRH) e criou o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos (SINGREH) (BRASIL, 1997).

A Resolução CONAMA 357/2005 dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões para o lançamento de efluentes nos corpos hídricos; além de qualificar por meio de características físicas e químicas, organolépticas, biológicas e quanto à toxicidade (BRASIL, 2005). Em complemento à esta, a Resolução CONAMA 430/2011 torna obrigatório o controle ecotoxicológico de efluentes industriais (BRASIL, 2005; 2011).

Até o presente momento, não existe no país nenhuma legislação baseada no potencial de desregulação endócrina das substâncias. Discussões acerca de diretrizes e protocolos para avaliação dos efeitos agudos e crônicos na biota aquática têm sido realizadas, porém, não existe legislação para avaliação dos efeitos e regulamentação dos contaminantes emergentes em matrizes ambientais, incluindo os interferentes endócrinos.

3.2 Contaminantes emergentes

Os contaminantes emergentes são substâncias não regulamentadas, e que podem atingir o meio ambiente por meio de diversas fontes antropogênicas (Figura 1), além de estarem distribuídas em diversos compartimentos ambientais (GAVRILESCU *et al.*, 2015). Os contaminantes emergentes (CEs), incluindo fármacos, produtos de higiene e cuidados pessoais (PPCPs), e interferentes endócrinos (IEs) são cada vez mais quantificados em águas superficiais, embora que em baixas concentrações, e há preocupação de que esses compostos possam ter um impacto na vida aquática (USEPA, 2008). De acordo com a *Water Quality Association* (WQA) dos Estados Unidos, os fármacos, produtos para cuidados pessoais (PCPs) e interferentes endócrinos (IEs) estão entre os principais exemplos de contaminantes emergentes (WQA, 2017).

Figura 1 - Exemplos de possíveis destinos de contaminantes no meio ambiente

Fonte: Adaptado de BARBOSA *et al.* (2016)

3.3 Interferentes endócrinos

Os interferentes endócrinos (IEs) referem-se a compostos naturais e sintéticos que podem causar uma variedade de efeitos adversos para a saúde ambiental e humana, interferindo na função normal do sistema endócrino (SUMPTER, 2005; CAMPBELL *et al.*, 2006; USEPA, 2008).

Os IEs exercem sua função por meio de receptores nucleares, como por exemplo os receptores de estrógenos (ER), de andrógenos (AR), de progestógenos (PR), e de tireóide (TR) (SCHUG *et al.* 2011). Os IEs são altamente heterólogos, constituídos por um amplo espectro de compostos com uma ampla gama de origens e estruturas diversas. Considerando a alta heterogeneidade dos IEs (GRUN, 2009), de acordo com o Conselho de Pesquisa Nacional (NRC, 1996), essas substâncias são classificadas em duas grandes categorias:

- (a) as que ocorrem naturalmente, e são encontradas em seres humanos e animais;
- (b) os IEs, que inclui: praguicidas, hormônios sintéticos, fármacos, produtos de higiene e cuidados pessoais, plastificantes e diversos outros compostos.

A interação hormônio-receptor pode ocorrer de duas maneiras: agonista, quando uma molécula hormonal se liga a um receptor provocando uma resposta que desencadeará um efeito biológico; ou antagonista, quando um hormônio se liga ao receptor bloqueando a ação antagonista de outro hormônio.

Existem muitos mecanismos pelos quais os interferentes endócrinos podem interferir e causar distúrbios no sistema endócrino. A ligação de um IE a um receptor hormonal celular é um dos mecanismos, e pode desencadear efeitos que levam às modificações na expressão gênica, interferindo na ação hormonal (WANG, 2016). Muitas pesquisas foram realizadas para rastrear a presença e a via de exposição potencial dos IEs no meio ambiente (COLBORN, 1996).

Devido à grande quantidade de produtos químicos sintéticos produzidos atualmente e o potencial de desregulação endócrina de um composto não ser prontamente determinado pela sua propriedade estrutural, a demanda por identificação e monitoramento de interferentes endócrinos é de grande importância (DIAMANTI-KANDARAKIS *et al.*, 2009; WANG, 2016).

3.4 Ocorrência e histórico dos interferentes endócrinos

Apesar dos estudos recentes, os efeitos de interferentes endócrinos são observados desde o início do século XX, tanto em relatos em seres humanos como na biota. Em 1930, Walker e Janney publicaram um estudo sobre a mimetização de hormônios endógenos por certos compostos químicos (WALKER e JANNEY, 1930). A publicação do livro *Our Stolen Future* por Theo Colborn (1996) serviu como um alerta para mais estudos no que diz respeito as substâncias com potencial de alteração endócrina.

Em 1939, foi descrito que compostos alquilfenólicos podiam causar efeitos endócrinos adversos por se ligarem ao receptor hormonal (JOBLING *et al.*, 1998). Um estudo realizado por Burlington e Linderman (1950) relatou que galos tratados com DDT apresentaram testículos menores e não possuíam cristas como galos normais (COLBORN *et al.*, 1996). Em 1965 foi publicado o primeiro artigo científico sobre hormônios em matrizes aquáticas por Tumm-Zollinger e Fair, mostrando que os esteróides não eram completamente removidos após o tratamento convencional de água e esgoto (TUMM-ZOLLINGER & FAIR, 1965).

Na década de 1970, trabalhadores de uma fábrica de produtos químicos tiveram drástica diminuição do número de espermatozóides após exposição ao kepone, produto químico utilizado como inseticida e matéria-prima para processamento de outros produtos (COHN, 1978). De acordo com HERBST *et al.* (1971), a cada 8 mulheres que faziam tratamento de carcinoma vaginal, 7 eram filhas de mulheres que haviam ingerido DES (dietilestilbestrol) nos três primeiros meses de gestação.

MCLACHLAN *et al.* (1992) detalharam em um estudo os danos reprodutivos provocados em camundongos machos que haviam sido expostos ao DES antes do nascimento, e em estudos seguintes mostraram que camundongos fêmeas apresentaram adenocarcinoma vaginal quando expostos ao DES no período pré ou neonatal.

Em meados de 1980 foi observada uma queda reprodutiva de jacarés que viviam no Lago Apokpa, Flórida - EUA. A quantidade de ovos eclodidos era abaixo da média e pesquisas mostraram uma morfologia anormal no ovário correlacionado ao aumento no nível de estradiol no sangue. Também foi observado que muitos jacarés possuíam pênis diminuto, e que os juvenis apresentavam baixa concentração de testosterona (GUILLETTE *et al.*, 1996b).

Durante autópsias para descobrir a causa mortis de baleias belugas no estuário de São Lourenço – Canadá, DE GUISE (1997) observou a presença de tumores malignos de mama, úlceras na boca, estômago, esôfago e intestino, possivelmente associados à compostos considerados interferentes endócrinos. Estudos já relataram que populações de mustelídeos e lontras canadense diminuíram nas regiões dos Grandes Lagos, onde essas espécies têm um alto

teor de peixe na dieta, sendo que os peixes da região dos Grandes Lagos contêm concentrações elevadas de organoclorados, pesticidas e bifenilas policloradas (WREN, 1991).

Em 1996 ocorreu em Weybridge, UK um fórum dedicado aos estudos do impacto dos interferentes endócrinos sobre a saúde humana e animal, e em 1997 na reunião da câmara ambiental do G8, foi estabelecida uma coordenação internacional visando ações específicas para os interferentes endócrinos (COM, 1999).

Em 2002 o Programa Internacional em Segurança Química (IPCS) publicou uma compilação de estudos contendo informações sobre a avaliação global em relação aos interferentes endócrinos.

No Brasil, foram publicados alguns trabalhos sobre IEs relatando efeitos após exposição. FERNANDEZ *et al.* (2002) relataram a exposição de organismos marinhos à compostos orgânicos contendo tributilestanho (TBT) e trifenilestanho (TPT) no litoral do Rio de Janeiro e Fortaleza; e o consequente desenvolvimento de caracteres sexuais masculinos em fêmeas de moluscos, fenômeno conhecido como “imposex”.

KOIFMAN e KOIFMAN (2003) apresentaram os resultados de um estudo epidemiológico, relacionando a exposição a pesticidas durante os anos 80 e os distúrbios reprodutivos, tais como, câncer de mama, ovário e próstata, diminuição nas taxas de esperma, observados nos anos 90 em estados brasileiros.

TORRES *et al.* (2002) investigaram a concentração e destino de praguicidas, bifenilas policloradas (PCBs) e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) na bacia hidrográfica do Rio Paraíba do Sul. Estudos mostraram as relações entre a exposição de organismos aquáticos à interferentes endócrinos e feminização, redução da fertilidade, e modificações morfológicas em órgãos reprodutivos (DIAMANTI-KANDARAKIS *et al.*, 2009).

De acordo com o *International Programme on Chemical Safety* – IPCS (2002), foram observados efeitos nos órgãos reprodutivos de peixes, que foram associados a exposição à estrógenos em águas superficiais, estuarinas, e zonas costeiras na Inglaterra. A presença de IEs na água foi relacionada à feminização de peixes (SVINGEN *et al.*, 2018; SOLÉ *et al.*, 2003).

Dentro os diversos efeitos observados em peixes, a indução da vitelogenina (VTG) em peixes juvenis ou machos tornou-se uma das respostas biológicas mais notáveis ligadas à exposição de IEs (TYLER & ROUTLEDGE, 1998; KIME *et al.*, 1999).

Atualmente, existem numerosos casos de indução de VTG em peixes em corpos hídricos na Europa, Japão e América do Norte com concentrações significativas de IEs (WHO, 2002). São diversas as fontes e classes de substâncias consideradas IEs; a Figura 2 sintetiza

alguns dos exemplos de compostos classificados como interferentes endócrinos que são continuamente encontrados no meio ambiente.

Figura 2 – Potenciais fontes e rotas de interferente endócrinos no meio ambiente

Fonte: Adaptado de BARRIOS-ESTRADA *et al.* (2018)

3.5 Atividade estrogênica em águas superficiais

Matrizes aquáticas ambientais contêm uma gama de poluentes orgânicos, onde incluem-se praguicidas, fármacos e compostos industriais. Porém, os efeitos de contaminantes emergentes e o efeito de misturas desses compostos em matrizes aquáticas não é totalmente esclarecido. Dentre os diversos compostos que atingem os corpos hídricos, os interferentes endócrinos têm atraído crescente atenção devido aos potenciais impactos tanto na vida selvagem como na saúde humana (BERGMAN *et al.*, 2013), principalmente aos efeitos adversos causados na biota, impedindo ou interferindo na função dos hormônios endógenos (KORTENKAMP, 2007; HUANG *et al.*, 2012; GOEPPERT *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2015).

Os interferentes endócrinos podem se ligar aos receptores hormonais, competir com hormônios endógenos na ligação com o receptor, estimular ou inibir os mecanismos de sinalização intracelular, alterar a expressão gênica e afetar as funções epigenéticas (LEUSCH *et al.*, 2010). Nos últimos anos, as técnicas bioanalíticas mostraram-se promissoras como ferramentas de triagem para a avaliação da qualidade da água, principalmente os bioensaios *in*

vitro, que respondem a compostos que atuam por modos de ação conhecidos e específicos (DIX *et al.*, 2007; REIF *et al.*, 2010).

Os bioensaios fornecem resultados em atividade estrogênica total (estrogenicidade) das amostras testadas e são expressas como concentrações equivalentes de 17 β -estradiol (E2) (EEQ) (JAROŠOVÁ *et al.*, 2015). Os bioensaios *in vitro* são considerados métodos de *screening*, de rápida execução, sensível e baixo custo comparados à outras ferramentas disponíveis, para estimar a atividade estrogênica total de compostos que atuam com o mesmo modo de ação (HILSCHEROVA *et al.*, 2000; JARQUE *et al.*, 2016).

Diversos estudos mostraram a aplicabilidade de bioensaios *in vitro* no monitoramento da atividade estrogênica em águas superficiais, água para consumo humano, e efluentes (VAN DER LINDEN *et al.*, 2008; LEUSCH *et al.*, 2010; JAROŠOVÁ *et al.*, 2014). De acordo com KINNBERG *et al.* (2003), dentre as diversas ferramentas bioanalíticas, os ensaios de transativação utilizando leveduras são os mais utilizados; nestes ensaios, substâncias com potencial estrogênico se ligam ao receptor e ativam sua transcrição.

O *Yeast Estrogen Screening* (YES) desenvolvido por ROUTLEDGE e SUMPTER (1996) é um bioensaio baseado na interação antígeno-anticorpo, onde a medida da atividade estrogênica é realizada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada, tendo a inserção de um receptor de estrógeno humano (hER). A resposta ocorre quando os IEs presentes na amostra interagem com o receptor e desencadeiam a resposta com variação na intensidade colorimétrica.

O *Bioluminescent Yeast Estrogen Screen* (BLYES), desenvolvido por SANSEVERINO *et al.* (2005), têm como principal diferença em comparação ao YES, a inserção do gene *luxCDABE* do *Photobacterium luminescens*, que em presença de compostos estrogênicos emite a bioluminescência (WANG, 2016). O BLYES foi utilizado neste estudo para quantificar a atividade estrogênica total presente nos extratos de amostras de água superficial.

Com a diversidade de IEs no ambiente aquático, e o fato de que os produtos químicos estão presentes em misturas complexas, em complementação aos bioensaios *in vitro* que quantificam a atividade hormonal, análises químicas são amplamente empregadas (SCOTT *et al.*, 2014; CONLEY *et al.*, 2017; KÖNIG *et al.*, 2017).

Os bioensaios em combinação com a análise química são valiosos não só na identificação de compostos que afetam a biota, mas também pela avaliação das ligações causais dos compostos no meio ambiente, quantificando a atividade estrogênica total em amostras ambientais (WANG *et al.*, 2012).

3.6 Caracterização química em amostras de água superficial

A caracterização química nos extratos de amostras de água superficial foi realizada empregando a técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS). A cromatografia é uma das técnicas mais utilizadas na identificação e quantificação espécies químicas.

O processo de cromatografia líquida força por pressões elevadas, a passagem do solvente, por meio de colunas fechadas, que contém partículas muito finas, proporcionando assim separações bastante eficientes (alta resolução). O dispositivo consiste em: um amostrador automático, um sistema de distribuição de solvente, uma válvula de injeção de amostra, uma coluna de alta pressão, e quando acoplado ao espectrômetro de massa, o mesmo atua como detector (HARRIS, 2010).

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica utilizada para identificar substâncias químicas, fornecendo informações qualitativas e quantitativas da composição de materiais orgânicos e inorgânicos (VEGA-BUSTILLOS, 2001). A análise consiste na geração de íons com base em compostos (orgânicos ou inorgânicos) por meio de um método de ionização apropriado.

Os íons são separados por relação massa-carga (m/z) em um analisador de massas e detectados quali/quantitativamente por meio de um detector. A magnitude do sinal elétrico em função da razão m/z é convertida por um processador de dados, que gera o espectro de massas correspondente. Os espectrômetros de massas são constituídos basicamente por uma fonte de acelerador de íons, analisador de massas e detector de íons (SILVERSTEIN, 1974).

Dentre os IEs mais encontrados em corpos hídricos estão os estrógenos naturais e sintéticos que entram na água superficial por meio de estações de tratamento de efluentes domésticos (BELFROID *et al.*, 1999), e de efluentes clandestinos que chegam aos corpos hídricos sem tratamento prévio. Além destes compostos, estão os esteróides de origem não-humana, em grande parte de origem de atividade pecuarista (YOST *et al.*, 2013).

Estrógenos naturais e estrógenos sintéticos são motivo de preocupação devido à sua potência em baixas concentrações e potencial de exposição à organismos não-alvo. Tais compostos podem ocorrer concomitantemente com outros IEs, formando misturas complexas. (SUMPTER, 2014; CONLEY *et al.*, 2017).

De acordo com LEUSCH *et al.* (2005), interações antagônicas e/ou sinérgicas podem ocorrer em amostras ambientais, e o potencial estrogênico total não pode ser avaliado utilizando-se caracterizações químicas das amostras. Além disso, os constituintes individuais de

misturas complexas que ocorrem no ambiente podem não ser conhecidos e os métodos podem não ser sensíveis a fim de quantificar os compostos (KORNER *et al.*, 2000; CALDWELL *et al.*, 2012).

As técnicas analíticas de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) e a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS) permitem melhores sistemas para identificar os interferentes endócrinos em amostras ambientais (WORRALL *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2007; MICIC & HOFMANN, 2009; YING *et al.*, 2009). Sendo assim, os bioensaios e caracterização química utilizados concomitantemente são recomendados (WANG *et al.*, 2012). O presente estudo investigou a presença de substâncias com potencial atividade endócrina, descritas brevemente a seguir.

3.6.1 Hormônios

Os hormônios desempenham um papel crucial na diferenciação celular normal no desenvolvimento dos organismos e, portanto, a exposição a substâncias que possam alterar a função normal do sistema endócrino pode interferir negativamente no processo de desenvolvimento (PAN-EU, 2015).

Os hormônios esteróides são derivados do colesterol e divididos em duas classes: corticosteróides (glicocorticoides e mineralcorticóides) e esteróides sexuais (andrógenos, estrógenos e progestógenos) (CORSINI *et al.*, 2018).

Os hormônios esteróides produzidos por seres humanos e animais são constantemente excretados e acabam chegando ao meio ambiente (LINTELMANN *et al.*, 2003; BAREL-COHEN *et al.*, 2006). A estrona (E1) e o 17 β - estradiol (E2) são os de maior preocupação ambiental, uma vez que exercem os seus efeitos biológicos em concentrações mais baixas em comparação a outros esteroides (PANTER *et al.*, 1998; ROUTLEDGE *et al.*, 1998), além do estradiol que é convertido em estrona (JÜRGENS *et al.*, 2002).

O estriol (E3) é considerado um hormônio de menor atividade biológica, em comparação aos citados anteriormente; e além destes, os hormônios sintéticos como o 17 α -etinilestradiol (EE2) e o mestranol também já foram encontrados no ambiente aquático (BLOTTNER *et al.*, 1998).

O interesse ambiental na identificação e investigação dos hormônios se deve ao potencial de alteração endócrina, uma vez que estes compostos podem interferir no funcionamento normal do sistema endócrino de organismos não-alvo. No presente estudo foram realizadas análises químicas em amostras de água superficial quanto à presença de hormônios

femininos naturais e sintéticos: estradiol, estrona, estriol, etinilestradiol, mestranol, levonorgestrel e distilestilbestrol; do hormônio masculino testosterona; e da progesterona.

3.6.2 Praguicidas

Os praguicidas são moléculas sintéticas desenvolvidas a fim de extinguir organismos específicos que atacam a produção agrícola. Existem diversas classes de praguicidas que foram desenvolvidas de acordo com o seu modo de ação, dentre esses grupos destacam-se os fungicidas, herbicidas e inseticidas (COMBARNOUS, 2017).

De acordo com a Lei Federal Brasileira nº. 7802, de 11 de julho de 1989 e o Decreto 4074 de 4 de janeiro de 2002, os praguicidas são definidos como:

"Produtos e fatores de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados a serem utilizados nos setores de produção, armazenamento e transformação de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção das florestas (nativas ou implantadas), dos ecossistemas e também dos ambientes urbanos, hídricos e industriais e destinados a mudar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-los de ações nocivas considerando organismos vivos nocivos".

Com o crescimento significativo da produção agrícola, esses compostos têm sido cada vez mais utilizados, no entanto, preocupações sobre os potenciais efeitos adversos dos praguicidas sobre a saúde ambiental e humana cresceram de forma constante (USGS, 1997). O que demonstra que são necessários mais estudos para obter informações sobre a toxicidade de substâncias isoladas, bem como das suas propriedades físicas e químicas.

Os praguicidas são desenvolvidos para apresentar toxicidade à um determinado grupo de organismos, porém podem acabar apresentando toxicidade a organismos não-alvo. Diversos estudos relataram que alguns praguicidas podem afetar a síntese e ou metabolismo hormonal, e são considerados potenciais interferentes endócrinos (EC, 2018; COMBARNOUS, 2017; MONNERET *et al.*, 2017; BRANDER *et al.*, 2016; PAN-EU, 2015).

O presente estudo investigou alguns praguicidas com potencial atividade estrogênica, foram selecionadas substâncias pertencentes às classes: inseticidas (fipronil, imidacloprida, carbofurano, malation), fungicidas (carbendazim, azoxistrobina, tebuconazole), e, herbicidas (simazina, atrazina, hexazinona, tebutiuron, ametrina, diuron, clomazona, 2,4-D). A presença e quantificação das substâncias foi realizada utilizando a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa.

3.6.3 Plastificantes: Bisfenol A

O Bisfenol A (BPA) foi sintetizado em 1891 por Alexander Dianin. O potencial estrogênico do BPA foi descoberto na década de 1930 (DODDS E LAWSON, 1936), quando os cientistas estavam procurando por produtos químicos sintéticos que poderiam substituir o estrogênio natural em aplicações farmacológicas. Porém, por ter uma baixa estrogenicidade quanto à substituição de um estrogênio natural em formulações, o BPA não teve aplicação clínica, e acabou tendo outras utilidades (BEAUSOLEIL *et al.*, 2018).

O BPA tem sido utilizado a mais de 50 anos como um monômero na produção de plásticos de policarbonato e como intermediário na síntese de resinas epoxídicas. De acordo com OEHLMANN *et al.* (2009), o BPA é um interferente endócrino, podendo causar efeitos adversos em organismos não-alvo. Considerando a atual importância do BPA como um IE, o presente estudo investigou a presença desse composto em amostras de água superficial do Estado de São Paulo.

3.6.4 Alquilfenóis: Octilfenol e Nonilfenol

Os alquilfenóis são substâncias formadas por um grupamento fenólico ligado a uma cadeia carbônica e principalmente utilizados na produção dos alquilfenóis etoxilatos (APEs) (BABY *et al.*, 2006). São substâncias de origem antropogênica, e constantemente encontradas em matrizes ambientais (AHEL *et al.*, 1994). Dentre as diversas substâncias pertencentes à essa classe, o nonilfenol e octilfenol destacam-se quanto ao seu potencial estrogênico (LAWS *et al.*, 2000).

O nonilfenol e o octilfenol são produtos químicos utilizados como surfactantes, principalmente nas indústrias de papel e celulose e têxtil, bem como na fabricação de detergentes domésticos e industriais (SERVOSET *et al.*, 2003).

A capacidade destes produtos químicos em atuar em conjunto com outros compostos estrogênicos, como 17 β -estradiol, estrona e o 17 α -etinilestradiol, produzindo uma ação estrogênica cumulativa para a biota tem sido investigada (DUSSAULT *et al.*, 2014). Nesse contexto, o presente estudo investigou a presença de nonilfenol e octilfenol em amostras de água superficial.

3.6.5 Agente antibacteriano: Triclosan

O triclosan é um antibacteriano utilizado em uma ampla variedade de produtos de higiene e cuidados pessoais, incluindo sabonetes, pasta de dente, produtos para o cabelo, limpeza doméstica, dentre outros. Recentemente, a popularidade dos produtos antibacterianos de consumo levou ao aumento do uso de triclosan (PERENCEVICH *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2018). Dentre as diversas características do triclosan, estudos sugerem que o composto possui potencial estrogênico (STOKER *et al.*, 2010; VELDHOF *et al.*, 2006). Considerando este cenário, o triclosan foi estudado quanto ao seu potencial estrogênico e incluído nas substâncias analisadas em amostras de água superficial utilizando LC-MS/MS.

3.6.6 Cafeína como indicador de contaminação fecal

A degradação dos ecossistemas aquáticos está diretamente relacionada à urbanização, bem como ao processo de desenvolvimento. A qualidade de vida está diretamente relacionada à disponibilidade e qualidade da água. O crescimento populacional e as atividades antropogênicas têm contribuído na piora dos problemas ambientais, principalmente aqueles relacionados à preservação dos recursos hídricos.

Diversos estudos de monitoramento ambiental têm como foco a caracterização de marcadores químicos que podem indicar a presença de contaminantes de origem antropogênica na água; dentre os vários marcadores químicos propostos inclui-se a cafeína (BUERGE *et al.*, 2003; KURISSERY *et al.*, 2012).

A cafeína é quase inteiramente relacionada ao ser humano, dado que praticamente não há lançamentos agrícolas ou industriais e, apesar da existência de fontes naturais de plantas, os níveis basais não são representativos (PEELER *et al.*, 2006). De acordo com VERENITCH & MAZUMDER (2008), em condições ambientais a cafeína é estável, e possui alta solubilidade e baixa volatilidade; fatores que permitem sua identificação em diversas matrizes ambientais.

O presente estudo investigou a presença de cafeína em amostras de água superficial a fim de correlacionar a presença deste composto, com substâncias potencialmente estrogênicas que chegam aos corpos hídricos via atividade antropogênica majoritariamente de descargas domésticas.

3.7 Avaliação de efeitos tóxicos em organismos não-alvo

Os bioensaios surgiram como ferramenta na avaliação dos efeitos tóxicos em organismos representativos do ecossistema. Na ecotoxicologia, a escolha dos organismos a serem utilizados na interpretação dos efeitos causados por exposição à xenobióticos leva em consideração uma série de fatores, tais como: representatividade, fácil cultivo e obtenção, ciclo de vida curto, sensibilidade e espécies com genética bem conhecida (APHA, 1998; RAND *et al.*, 1995).

O sistema aquático recebe continuamente uma gama de substâncias de diversas fontes, dentre estas, as atividades antrópicas. O que faz com que a fauna aquática esteja em contato direto com as substâncias que chegam aos corpos hídricos. A biota aquática apresenta diversas espécies que atualmente são utilizadas em avaliação de efeitos tóxicos por xenobióticos, de produtores à consumidores secundários.

3.7.1 Peixes como modelo na avaliação de efeitos tóxicos e IEs

Dentre as diversas espécies utilizadas em programas de monitoramento ambiental, os peixes apresentam vantagens no que diz respeito à modelos ambientalmente relevantes. São de fácil cultivo em laboratório e baixo custo de manutenção; possuem um curto ciclo de vida, e alta produção de ovos. Além do que, vias metabólicas entre os peixes e outros vertebrados superiores foram conservadas, o que permite a extrapolação de alguns efeitos observados para outras espécies (MILLER & ANKLEY, 2004).

Nesse contexto, os peixes são considerados organismos sentinelas ideais para o monitoramento da poluição, particularmente para a avaliação de efeitos causados por interferentes endócrinos (POPESKU *et al.*, 2008). Nos peixes, os efeitos avaliados após exposição aos IEs geralmente são: surgimento de características sexuais secundárias, diferenciação nas gônadas, impactos reprodutivos, indução de vitelogenina, dentre outros.

Como uma alternativa ao uso de animais em ensaios ecotoxicológicos, o uso de embriões de peixes tem sido empregado na avaliação de efeitos biológicos. Os embriões de até 96 horas não estão na Diretiva Europeia 2010/63/EU (EU, 2010), o que viabiliza a utilização embriões de peixes em programas de monitoramento ambiental.

Considera-se que os períodos *in utero*, durante embriogênese ou períodos reprodutivos são os mais suscetíveis aos efeitos dos interferentes endócrinos (WHO, 2002). A exposição aos IEs durante o desenvolvimento embrionário pode resultar em alterações celulares e teciduais,

podendo levar a patologias reprodutivas ou alterações metabólicas na vida adulta dos indivíduos.

A sensibilidade dos embriões a este grupo de xenobióticos deve-se ao fato de que os mecanismos de reparação do DNA, enzimas de detoxificação e barreira hemato-encefálica não estão completamente desenvolvidos (SCHUG *et al.*, 2011). Além disso, sugere-se que alterações nas células germinativas provocadas por exposição aos IEs podem afetar a descendência dos indivíduos expostos (ação transgeracional) (SKINNER *et al.*, 2011).

De acordo com JOBLING & TYLER (2003), existe a transferência materna de IEs para as reservas lipídicas dos ovos. Sendo assim, os compostos presentes na reserva lipídica podem ser metabolizados pelos embriões. Os embriões também podem ser expostos a compostos presentes na água por meio do córion, mesmo que este atue como uma proteção, alguns xenobióticos podem atravessá-lo (SCHOLZ *et al.*, 2008).

Em um estudo realizado por EMBRY *et al.* (2010), alguns efeitos são observados tanto em organismos adultos, quanto em embriões: batimento cardíaco, curvatura, formação de somitos, desprendimento da cauda, dentre outros. A Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), recomenda algumas espécies a serem utilizadas como modelo no estudo com interferentes endócrinos, dentre as quais destacam-se: *Pimephales promelas*, *Oryzias latipes* e *Danio rerio* (OECD, 2013). O presente estudo utilizou o peixe *Danio rerio* como organismo modelo nos bioensaios *in vivo*.

3.7.1.1 *Danio rerio*

É um peixe teleósteo, pertencente à família dos ciprínídeos. Originário em torno das bacias do rio Ganges e Brahmaputra no nordeste da Índia, Bangladesh e Nepal. O *Danio rerio* é popularmente conhecido como *zebrafish* ou paulistinha. Foi inicialmente descrito como habitando corpos d'água lóticos, córregos e valas; particularmente adjacente aos campos de arroz (STERBA, 1962; JAYARAM, 1999). Vêm sendo consagrado como um excelente modelo animal em pesquisas de diferentes áreas, como por exemplo médica, toxicológica e ambiental.

Dentre os diversos atributos do *zebrafish* que o torna uma espécie modelo para uso em pesquisas científicas, inclui-se sua natureza robusta e social, alta reprodutividade durante o ano todo, taxas de crescimento rápidas, embriões transparentes e genoma estabelecido (LAWRENCE, 2007; SPENCE *et al.*, 2005). Apresenta um rápido desenvolvimento embrionário, da fecundação à eclosão leva-se em média 96 horas. A fecundação é externa, com córion transparente, o que facilita os estudos do desenvolvimento do organismo.

O *zebrafish* é uma espécie considerada gonocórica indiferenciada, ou seja, inicialmente as gônadas possuem estruturas semelhantes; entre 15 e 20 dias pós-fecundação (dpf) todos os organismos apresentam estrutura gonadal indiferenciada, e 30 dias após a eclosão a gônada intersexual começa a se diferenciar em testículos, ou continua o desenvolvimento inicial aumentando o tamanho dos oócitos (TAKAHASHI, 1977). A embriogênese do *Danio rerio* foi descrita por KIMMEL *et al.* (1995), com sete períodos de desenvolvimento definidos (Figura 3 e Figura 4).

Figura 3 – Etapas da embriogênese do *Danio rerio*

(i)Fertilização–zigoto; (ii)Clivagem (0,75–2,25hpf); (iii)Blástula (2,25–5,25hpf); (iv)Gástrula (5,25–10hpf) e (v)Segmentação (10–24hpf)

Fonte: Adaptado de KIMMEL *et al.* (1995)

Figura 4 – Desenvolvimento embrionário do *Danio rerio*

(vi)Faríngula (24–48hpf); (v)Eclosão (48–72hpf)

Fonte: Adaptado de KIMMEL *et al.* (1995)

3.8 Fish Embryo Toxicity (FET) teste

O bioensaio *Fish Embryo Toxicity* (FET) teste foi originalmente desenvolvido como uma alternativa à testes de avaliação de efeito agudo com peixes, podendo avaliar os efeitos letais em estágios embrionários e dispensando a utilização de organismos adultos. A extensão da duração do FET abrange avaliação de outros *endpoints*, tais como: teratogenicidade, atividade de dioxinas, mutagenicidade, neurotoxicidade e desregulação endócrina (BRAUNBECK *et al.*, 2015).

De acordo com BRAUNBECK (2005), os ensaios com ovos e larvas de *Danio rerio* são uma alternativa a utilização de organismos adultos, e fornece uma boa resposta quanto à exposição a agentes químicos presentes em matrizes ambientais.

A utilização da espécie de peixe *Danio rerio* em bioensaios *in vivo* tem sido amplamente utilizada em âmbito internacional, pois esta espécie foi indicada como um excelente modelo animal experimental, devido à sua capacidade de adaptação a diversas condições ambientais, o que o fez ser considerado um bom bioindicador, podendo assim promover a integração de resultados e pesquisas realizadas em todo o mundo (KIDD *et al.*, 2007; SELDERSLAGHS *et al.*, 2009; LANGE *et al.*, 2012; BAUMANN *et al.*, 2014).

Os estágios iniciais do desenvolvimento de organismos são na maioria das vezes as fases mais sensíveis às alterações causadas por exposição à xenobióticos. Devido principalmente às mudanças na diferenciação celular, proliferação e migração necessária para formar múltiplos tipos celulares, tecidos e órgãos (RUBINSTEIN, 2003).

Nos embriões de *zebrafish* considera-se que o período de até 120 horas pós fecundação é o ideal para avaliação dos efeitos no desenvolvimento; pois os embriões obtêm seus nutrientes por meio do saco vitelino (que dura em média até cinco dias). Além disso, os embriões desenvolvem-se externamente, o que permite uma avaliação de todo o processo de formação do organismo (SUPATTO *et al.*, 2011).

Caso o organismo não venha a óbito, as perturbações ocorridas no desenvolvimento podem acarretar alterações morfológicas e/ou comportamentais; a exposição à mistura de substâncias pode não causar efeitos biológicos adversos. Assim, a questão de quais misturas estão presentes e quais os efeitos combinados associados torna-se central para a definição de estratégias de monitoramento e avaliação adequadas (ALTENBURGER *et al.*, 2015).

O presente estudo propôs a utilização do bioensaio FET a fim de avaliar os possíveis efeitos causados pela mistura de substâncias presentes na água superficial. Além dos efeitos agudos, foram avaliados efeitos sub-letais (crônicos). E ao final do ensaio, os organismos sobreviventes de amostras que não apresentaram toxicidade, foram congelados para posterior análise de biomarcadores.

3.9 Biomarcadores

A exposição contínua a substâncias consideradas interferentes endócrinos está associada a alterações bioquímicas, histológicas, diminuição da fertilidade, atraso na eclosão de ovos, modificações comportamentais e de acasalamento em diversas espécies de peixes, anfíbios, crustáceos, moluscos e gastrópodes (MEHRLE e BERGMAN, 2012; GIUSTI *et al.*, 2014; GARMSHAUSEN *et al.*, 2015). Alguns biomarcadores são utilizados para avaliar os efeitos causados por interferentes endócrinos em níveis sub-celulares e moleculares, como por exemplo a quantificação da expressão de vitelogenina.

De acordo com STEGEMAN (1995), as alterações promovidas pela presença de poluentes ocorrem desde o nível bioquímico ou molecular, tanto em nível fisiológico, até os níveis de população e ecossistema. As alterações no nível bioquímico são usualmente as primeiras respostas às mudanças ambientais passíveis de serem detectadas e quantificadas (SANTOS & MARTINEZ, 2012).

A exposição às substâncias químicas, seus metabólitos e espécies reativas de oxigênio (ROS) pode ocasionar danos em organelas e moléculas biológicas. Para avaliar estes danos, são indicados biomarcadores de efeitos citogenotóxicos.

A peroxidação lipídica (LPO) é uma consequência de reações com radicais livres que levam à destruição de lipídios presentes na membrana (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Na molécula de DNA as quebras são frequentemente induzidas pela exposição a agentes estressores, tais alterações biológicas resultam da interação com radicais de oxigênio, ou estão relacionadas a processos apoptóticos (VIARENGO *et al.*, 2007).

O estresse ambiental nos organismos pode gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) que são capazes de induzir danos aos lipídios da membrana e às moléculas de DNA, bem como às defesas antioxidantes (AMIARD-TRIQUET *et al.*, 2012), conforme ilustrado na Figura 5.

Figura 5 – Relação do estresse ambiental com os biomarcadores

Fonte: Adaptado de AMIARD-TRIQUET *et al.*, 2012

Os peixes são muito utilizados como organismos-teste em análise de enzimas e produtos responsáveis pela manutenção de vias que regulam os efeitos causados por substâncias químicas estressoras (RIVERO-WENDT, 2013).

Os biomarcadores de peixes são excelentes ferramentas para monitorar a saúde do ecossistema aquático e têm sido incluídos em vários programas de monitoramento ambiental atualmente (WALKER *et al.*, 1996).

Por fornecerem uma rápida resposta dos efeitos dos poluentes, podem sugerir as relações de causa-efeito entre a exposição aos contaminantes e os efeitos observados e documentar os efeitos integrados do estresse químico nos animais. VAN DER OOST *et al.*

(2003) propuseram critérios com as informações mais importantes que devem estar estabelecidas e disponíveis:

- (a) O ensaio para quantificar um biomarcador deve ser confiável, de fácil e rápido desenvolvimento e baixo custo;
- (b) Para servir como um parâmetro de análise preditiva, o biomarcador deve ser sensível à exposição e aos efeitos causados pelos contaminantes;
- (c) A variabilidade natural das possíveis alterações induzidas pelo contaminante e os impactos dos fatores que atuam sobre o biomarcador devem estar bem estabelecidos;
- (d) A resposta do biomarcador com a exposição ao poluente (concentração e tempo) devem estar estabelecidos;
- (e) O significado toxicológico do biomarcador deve estar estabelecido, a relação entre a resposta e o impacto no organismo.

Os biomarcadores têm sido amplamente utilizados para fornecer a conexão entre níveis externos de exposição ao contaminante, níveis de contaminação em níveis sub-celulares e efeitos adversos precoce nos organismos, conforme ilustrado na Figura 6 (KROON *et al.*, 2017). O presente estudo avaliou efeitos sub-celulares em embriões de *Danio rerio* após 96 horas de exposição a amostras de água superficial, foram utilizadas as técnicas de biomarcadores: peroxidação lipídica, quantificação totais de proteínas e danos em DNA.

Figura 6 – Consequências ecológicas devido à exposição aos contaminantes

Fonte: Adaptado de AMIARD-TRIQUET *et al.*, 2012

4 METODOLOGIA

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Química e Meio Ambiente do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), e teve colaboração externa com: o Setor de Análises Toxicológicas da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), o Laboratório de Química Ambiental do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Laboratório de Toxinologia Aplicada (LETA) do Instituto Butantã, e com o Laboratório de Estudos em Poluição e Ecotoxicologia Aquática da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP – Campus Baixada Santista).

4.1 Locais de amostragem

A escolha dos locais de amostragem foi baseada em resultados de um estudo de monitoramento de 35 locais realizado em 2013 e 2014 pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo quanto a presença de atividade estrogênica (CETESB, 2013;2014).

Por meio deste estudo prévio foram selecionados os 10 pontos amostrais (Figura 7) com os maiores valores de atividade estrogênica medida no período (2013 – 2014) para a investigação e avaliação dos efeitos biológicos em organismos aquáticos visando a proteção da biota aquática durante 2015 e 2016.

O ensaio de identificação e quantificação da atividade estrogênica foi realizado no Setor de Análises Toxicológicas da CETESB. As informações da localização e informações sobre os locais estudados estão resumidos e apresentados na Tabela 1.

Figura 7 – Mapa da localização dos pontos de amostragem em 2015 e 2016

Tabela 1 – Informações dos locais de amostragem (DAEE, 2017)

<i>UGRHIs</i>	<i>Locais amostrados</i>	<i>Classe do corpo d'água</i>	<i>Localização</i>	<i>Descrição dos locais/Classificação da UGRHI</i>
Alto Tietê	Reservatório Guarapiranga (São Paulo, SP)	0	23°45'15" S 46°43'37" W	Alta densidade populacional. As áreas Nordeste e Sudeste estão sob proteção dos mananciais (898/75 e 1172/76), e o reservatório destina-se a abastecimento público, e recreação.
	Ribeirão Pires (Ribeirão Pires, SP)	2	23°42'52" S 46°25'45" W	Alta densidade populacional, área urbanizada, com recebimento de efluentes domésticos e industriais.
Mogi Guaçu	Rio Araras (Araras, SP)	2	22°16'46" S 47°13'23" W	Uso agrícola, urbano e industrial da água e do solo. Plantação de cana de açúcar, citros e milho próximo ao rio.
Tietê Jacaré	Ribeirão Grande (Bauru, SP)	2	22°15'39" S 48°48'35" W	Presença de usinas de açúcar e álcool, mineração, produção de couro e fundições. O uso da água público e industrial, recebimento de efluentes domésticos e industriais.
Mantiqueira	Rio Sapucaí-Guaçu (Campos do Jordão, SP)	2	22°42'58" S 45°33'36" W	Parte desta UGRHI está em Unidade de Conservação. O uso predominante da água é para abastecimento público e remoção de efluentes domésticos e industriais.
Piracicaba, Capivari e Jundiá	Rio Piracicaba (Limeira, SP)	2	22°41'51" S 47°23'14" W	Desenvolvimento industrial e alta densidade populacional. Plantações de cana-de-açúcar, laranja e eucalipto. As atividades nesta UGRHI incluem: indústrias agropecuárias e têxteis, metalúrgicas e eletro-eletrônicas. O uso da água é designado para abastecimento público e industrial, remoção de efluentes industriais e domésticos, na irrigação de plantações e recreação.
	Rio Jaguari (Bragança Paulista, SP)	2	22°52'39" S 46°36'26" W	
Alto Paranapanema	Rio São Miguel Arcanjo (São Miguel Arcanjo, SP)	2	23°53'18" S 48°01'32" W	Os usos da água incluem o abastecimento público e industrial, a recepção de efluentes domésticos e industriais e a irrigação. Parte dessa UGRHI está em localizada em uma unidade de conservação.
Paraíba do Sul	Reservatório Jaguari (Santa Isabel, SP)	2	23°17'38" S 46°14'02" W	Parte do Sistema Cantareira, usa água potável para abastecer a Região Metropolitana de São Paulo, fornecendo água para aproximadamente 8,8 milhões de pessoas.
Peixe	Reservatório Cascata (Marília, SP)	2	22°12'48" S 49°55'22" W	Utilizado principalmente para o abastecimento público da região. Recebe também efluentes domésticos e tem uma área destinada para recreação e pesca.

¹UGRHIs: unidades de gerenciamento de recursos hídricos

4.2 Coleta das amostras

As amostras de água superficial foram coletadas de acordo com o Guia Nacional de Coletas de Amostras (ANA, 2011), com frascos novos de 1 litro, na cor âmbar, que foram previamente aquecidos a 400 °C a fim de eliminar possíveis resíduos orgânicos. Após a coleta, as amostras foram mantidas no laboratório refrigerados, sem adição de conservantes, até a realização da extração em fase sólida (SPE) em até 7 dias após a data da coleta.

As coletas foram bimestrais, sendo realizadas 6 amostragens por local e ano nos dez locais selecionados, totalizando 116 amostras em todo o período em que o estudo foi conduzido. A cada preparo de amostras por SPE, também foi realizado um branco de água ultrapura, que também foi testado no BLYES e LC-MS/MS. Os extratos foram mantidos abaixo de 0 °C por até 90 dias para realização das análises biológicas e químicas.

4.3 Preparo das amostras

O preparo das amostras para os ensaios biológicos e análises químicas consistiu em extração em fase sólida (SPE). A extração em fase sólida (SPE) foi realizada a vácuo utilizando um extrator automático SPE-DEX® 4790, conforme ilustrado na Figura 8a com discos Oasis HLB (*Hydrophilic-lipophilic-balance*, *Horizon*®) de alta capacidade. Os discos foram condicionados com 15 ml de metanol e 10 ml de água ultrapura. Após a percolação da amostra, os discos HLB foram secos utilizando nitrogênio por 15 minutos.

A eluição dos discos foi realizada com 5 ml de metanol em três repetições. Após a eluição dos analitos, as amostras foram armazenadas em tubos de vidro de 40 ml. Posteriormente foram transferidas com auxílio de Metanol (Grau UV-Pesticida) para tubos de 1,8 ml, foram secas utilizando um concentrador rotativo à vácuo Genevac® (Figura 8b) em 35 °C até a evaporação do metanol, e mantidas em freezer -20 °C por até 90 dias.

Toda a vidraria não volumétrica utilizada no preparo das amostras, tais como: frascos, pipeta Pasteur e vials foram aquecidas a 400 °C por 4 horas para eliminação de possíveis resíduos orgânicos. A eficiência da SPE foi avaliada por meio da recuperação apresentada no item 8.1.

Figura 8 – ^(a)Extração em fase sólida (SPE); ^(b)Concentrador de amostras

Fonte: ^(a)Gisela Martini; ^(b)https://www.spscientific.com/Products/Centrifugal_Evaporators

4.4 Bioluminescent Yeast Estrogen Screen (BLYES)

O bioensaio *in vitro* utilizado para quantificar a atividade estrogênica presente nas amostras foi o *Bioluminescent Yeast Estrogen Screen* (BLYES) desenvolvido por SANSEVERINO *et al.* (2005). O ensaio foi realizado no Setor de Análises Toxicológicas da CETESB.

Neste ensaio as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foram modificadas tendo a inserção de gene para o receptor de estrogênio humano (hER), além de um plasmídeo contendo genes para produção de luz, extraídos de bactérias luminescentes. Em paralelo ao BLYES, foi realizado um teste de controle de toxicidade com uma linhagem que emite luz continuamente (BLYR).

De acordo com WANG (2016), quando um composto estrogênico atravessa a membrana celular da levedura, o composto se liga ao receptor de estrogênio humano, e este complexo se liga a um elemento responsivo ao estrogênio (ERE), localizado na região promotora do plasmídeo, ativando a transcrição de *luxA* e *luxB*, que produz a enzima luciferase, conforme ilustrado na Figura 9. A enzima luciferase é responsável pela produção de bioluminescência, na presença do substrato luciferina (também produzido pela linhagem).

Figura 9 – Esquema do bioensaio BLYES

Fonte: Adaptado de WANG (2016)

Já a linhagem BLYR não possui o gene para receptor de estrogênio, apenas contendo os plasmídeos para produção contínua de luciferase e luciferina. A linhagem produz luz continuamente, se existe redução na produção de luz é referente à ação tóxica dos componentes da amostra. As concentrações onde é observada toxicidade não são utilizadas para avaliação da atividade estrogênica, pois a toxicidade subestima a atividade estrogênica devido à redução de produção de luz.

O controle positivo utilizado foi a solução padrão de 17β -estradiol (E2), com concentrações na faixa de $2,5 \cdot 10^{-13}$ a $1 \cdot 10^{-7}$ mols L^{-1} , e os controles negativos foram: solução de dimetilsulfóxido (DMSO) 4% e água ultrapura. A descrição do preparo das soluções para o ensaio está apresentada no item 8.2.

Na realização do ensaio, o extrato foi ressuspensionado em DMSO e o volume completado com água ultrapura. Foram testadas nove diluições de cada extrato de amostra de água superficial. A concentração final de DMSO nas diluições das amostras, no controle positivo e no controle negativo foi de 4% utilizando água como diluente.

Após a pipetagem das amostras, controle positivo e negativo na placa de 96 poços, foram adicionados 100 μL da solução contendo leveduras em cada poço e a placa foi incubada por cerca de 4 horas a 30 °C. A leitura das placas foi realizada em um luminômetro (Victor X3® Perkin Elmer), e os resultados foram expressos quantitativamente por meio da atividade estrogênica equivalente (E2 eq) por litro de amostra (EEQ).

4.5 Caracterização química

A técnica analítica utilizada na identificação e quantificação dos compostos foi Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). As análises foram realizadas no Laboratório de Química Ambiental do Instituto de Química da UNICAMP, sob coordenação da Profa. Dra. Cassiana Carolina Montagner.

Os métodos dos compostos analisados no presente estudo foram conduzidos de acordo com MONTAGNER *et al.* (2014) e JARDIM *et al.* (2012). Todos os reagentes utilizados nas análises foram de grau HPLC, sendo que o metanol utilizado nas injeções foi de grau nanograde ou pesticida. Os extratos das amostras de água superficial previamente preparados por SPE, foram ressuspensos em solução de H₂O:MeOH 70:30 (v/v) e para serem analisados por LC-MS/MS.

4.5.1 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

As substâncias alvo analisadas nas amostras de água superficial foram determinadas por Cromatografia líquida acoplada à Espectrometria de Massas com analisador de massas triplo quadrupolo (QqQ) empregando-se ionização por eletronebulização (ESI, electrospray ionization) (Agilent Technologies) de acordo com MONTAGNER *et al.* (2014) e JARDIM *et al.* (2012).

Os parâmetros instrumentais das substâncias analisadas por LC – MS/MS estão descritas na Tabela 2. Os hormônios sintéticos mestranol e levonorgestrel, e o bactericida triclosan foram analisados apenas nas amostras referentes ao ano de 2015; e a hidroxiatrazina foi incluída nas substâncias analisadas nas amostras referentes a 2016. Além das substâncias alvo, foram analisadas amostras de água ultrapura (brancos) que passaram pelo processo de preparo de amostras por SPE.

A quantificação foi realizada com padrões analíticos com pureza superior a 97% da Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha), Riedel-de Haën (Seelze, Alemanha) ou Fluka Analytic (Milwaukee, EUA) a partir de diluições sucessivas da solução estoque (400 mg L⁻¹) preparada a partir dos padrões sólidos.

O cromatógrafo utilizado foi Agilent modelo 1200, com bomba binária, injetor automático e compartimento de coluna termostatizado. A separação cromatográfica foi realizada com coluna Zorbax SB-C18 a 25 °C. A fase móvel foi constituída de água ultrapura e metanol, filtrados em membrana com 0,2 µm de porosidade, contendo 0,01% (v/v) de NH⁴⁺ (utilizado como um aditivo à formação de íons).

Entre cada corrida cromatográfica, o sistema reestabeleceu as condições iniciais e o tempo total de cada corrida foi de 16 minutos, com vazão de 0,3 ml min⁻¹. A identificação e quantificação dos compostos foi realizada por espectrometria de massas em equipamento Agilent com triplo quadrupolo (Modelo 6410B), equipado com bomba à vácuo auxiliar operando na célula de colisão.

Os analitos foram ionizados em uma fonte de eletronebulização nos modos positivo e negativo. Na célula de colisão foi utilizado nitrogênio, bem como gás de secagem a uma vazão de 10 mL min⁻¹ (350 °C). A quantificação foi realizada no modo *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), onde cada sistema precursor-produto é específico para cada composto analisado.

Tabela 2 – Parâmetros instrumentais de cada composto para LC-MS/MS

Classe	Fórmula estrutural	Compostos	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (eV)	ESI	LQ (ng L ⁻¹)
Estimulante		Cafeína	195,1	138,1	15	(+)	1,80
				110,1	20		
				69,1	30		
Hormônio sintético		17α-Etinilestradiol	295,0	144,9	30	(-)	6,59
				158,9	30		
				143,0	40
	Dietilstilbestrol	267,2	222,0	30	(-)	2,00
				237,0	25
	Mestranol	311,2	121,1	20	(+)	74,93
				91,0	30		
Hormônios naturais		17β-Estradiol	271,1	91,2	60	(+)	15,01
				109,1	20		
				183,0	35		
Hormônios naturais		17β-Estradiol	271,1	144,9	30	(-)	4,64
				143,0	40		

*Continua na próxima página

			119,0	25
	Nonilfenol	219,0	106,0	15	
			119,0	35	(-)	1,64
Praguicidas		Ametrina	228,2	186,1	15	
			158,1	20	(+)	0,48
			138,1	20
	Atrazina	216,2	174,1	15	
			103,9	15	(+)	0,72
	Simazina	202,0	124,0	15	
			132,1	15	(+)	0,49
			104,0	25
	Carbofurano	222,0	165,0	10	
			123,0	20	(+)	1,69
	Hexazinona	253,2	171,1	8	
			85,1	30	(+)	0,33
	Azoxistrobina	404,2	372,0	5	
					(+)	3,12

			344,1	20
Carbendazim	192,1	160,1	5		
			132,1	30	(+)	4,72
			105,1	35
Clomazona	240,1	200,3	1	(+)	12,07
Diuron	235	72,1	20	(+)	11,72
			46,0	16
Tebuconazole	308,2	70,0	20	(+)	0,39
			124,9	30
Imidacloprido	256,0	208,9	10	(+)	2,71
			175,1	15
Fipronil	435,0	250,0	25	(-)	1,02
			330,0	25
Tebutiuron	229,0	172,1	10	(+)	4,72
			116,1	30
Malation	331,0	127,0	1	(+)	0,69

			99,1	15
Hydroxiatrazina	198,2	156,2	15		
			114,1	20	(-)	1,56
2,4-D	220,9	161	14		
			218,9	18	(-)	1,19

4.6 Bioensaio *in vivo* com *Danio rerio*

Os efeitos tóxicos após exposição às amostras de água superficial foram avaliados por meio do bioensaio *in vivo* Fish Embryo Toxicity (FET) teste, de acordo com o protocolo da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) N° 236 (OECD, 2013).

Visando a menor utilização de organismos de alta complexidade em testes laboratoriais, a OECD N° 236 utiliza embriões do peixe *Danio rerio* para testar amostras de efluentes, águas continentais e substâncias químicas. O FET teste avalia os efeitos letais e sub-letais nos organismos expostos.

Com o emprego de embriões na avaliação de efeitos biológicos, em um mesmo ensaio é possível observar a ocorrência do desenvolvimento, a diferenciação e o crescimento celular, que ocorrem paralelamente (SCHOLZ *et al.*, 2013; BRITTIJN *et al.*, 2009).

Os embriões foram cedidos pelo Laboratório de Toxinologia Aplicada (LETA) no Instituto Butantã. Os ovos foram analisados em estereoscópio e selecionados para realização do ensaio. Os critérios de escolha foram: ovos fertilizados e desenvolvidos até a 4 hora pós fecundação (4 hpf).

Após a seleção foram inseridos 2 ovos por poço, em placas de 24 poços contendo 2 ml de amostra. E em cada placa, 4 poços foram utilizados como controle interno contendo apenas água de diluição (Meio MS). As placas foram mantidas em incubadora, sob temperatura controlada ($26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) por 96 horas.

Foram realizados ensaios em triplicata para cada amostra, com o total de 120 organismos. A leitura das placas foi realizada em microscópio invertido AXIOcam Erc 5s Vert. A1 – Zeiss®. Os efeitos letais (agudos) avaliados foram: ausência de batimentos cardíacos, não desprendimento da cauda, ausência de somitos e ovo coagulado (Figura 10).

Figura 10 – Efeitos agudos avaliados no FET teste
(a) Ovo coagulado; (b) Embrião em formação (ausência de batimentos cardíacos)

Fonte: Gisela A. Martini

Os efeitos sub-letais avaliados foram: microcefalia, tamanho reduzido do organismo, curvatura da coluna vertebral, edema cardíaco e/ou vitelínico (Figura 11). A microcefalia foi avaliada somente nas amostras correspondentes ao ano de 2015. Em paralelo a cada ensaio com as amostras ambientais foi realizado um controle (Figura 12), contendo apenas água de diluição (Meio MS), mantido nas mesmas condições das placas contendo amostras.

Figura 11 – Efeitos sub-letais avaliados no FET teste

^(a)Organismo com tamanho reduzido, curvatura e edema; ^(b)Organismo com tamanho reduzido; ^(c)Organismo com curvatura; ^(d)Organismo com formação de edema cardíaco e vitelínico

Fonte: Gisela A. Martini

Figura 12 – ^(a)Organismo normal, ^(b)Organismo normal não eclodido, ^(c)Organismo normal recém eclodido

Fonte: Gisela A. Martini

A fim de garantir a qualidade dos resultados obtidos, a cada ensaio realizado foi avaliada a sensibilidade dos organismos frente à uma substância referência. No presente estudo, foi escolhido o cloreto de zinco (ZnCl_2), testado nas concentrações de: 10; 20; 40; 80 e 160 mg L^{-1} . Como controle positivo do ensaio foi testada a 3,5 Dicloro Anilina na concentração de 4 mg L^{-1} , tendo como critério a letalidade $\geq 30\%$ dos organismos expostos, de acordo com a OECD N°236.

Os resultados dos ensaios de sensibilidade com ZnCl_2 e do controle positivo com a 3,5 Dicloro Anilina estão apresentados no Item 8.3. Após a leitura das placas, os organismos sobreviventes foram congelados para posterior análises de biomarcadores. A avaliação estatística dos efeitos analisados foi realizada utilizando o Software TOXSTAT® 3.5.

4.7 Biomarcadores

Biomarcador é considerado qualquer alteração biológica relacionada à presença de um composto químico no ambiente em nível sub-indivíduo e indica um desvio no estado normal que não pode ser detectada no organismo intacto (VAN GESTEL & VAN BRUMMELEN, 1996).

Foram realizadas análises de biomarcadores (peroxidação lipídica e danos em DNA) a fim de verificar os possíveis efeitos sub-celulares causados pelas substâncias químicas presentes nas amostras de água superficial. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Estudos em Poluição e Ecotoxicologia Aquática da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP – Baixada Santista). Foi utilizado o Leitor de microplacas Biotek Synergy HTX e software Gen5™ na leitura das placas e aquisição dos dados.

4.7.1 Peroxidação lipídica

Peroxidação lipídica é a degradação oxidativa dos lipídios que resulta em danos celulares. O estresse oxidativo é parte do processo de envelhecimento e ocorre em todos os organismos vivos quando as espécies reativas de oxigênio (ou seus subprodutos) causam lesão celular e tecidual (WINSTON 1991; KELLY *et al.* 1998). A peroxidação lipídica prossegue por 3 mecanismos distintos:

1. oxidação mediada por radicais livres,
2. oxidação não enzimática independente de radicais livres e
3. oxidação enzimática (YOSHIDA *et al.*, 2013)

No presente estudo foi seguida a metodologia descrita por WILLS (1987). As informações sobre o preparo de soluções e etapas realizadas estão apresentadas no item 8.4.1.

4.7.2 Danos em DNA

A detecção e quantificação dos danos ao DNA permitem sua utilização como biomarcador de genotoxicidade em condições agudas ou crônicas (VASSEUR *et al.*, 2012). Normalmente, as condições de estresse induzem distúrbios celulares nos organismos e aumento do dano do DNA.

A preservação da integridade da molécula de DNA é fundamental para todos os organismos vivos e possuem sistemas de proteção eficientes para o seu material genético. Entre o primeiro contato de um xenobiótico com a molécula de DNA e uma possível mutação, uma sequência de eventos é produzida começando com a formação direta ou indireta de adução de DNA. As modificações secundárias do DNA produzido podem ser induzidas por estresse oxidativo e correspondem a um aumento do nível de reparo ou oxidação da base (ALMEIDA *et al.*, 2007; SOLÉ *et al.*, 2008).

Quando os distúrbios no DNA se tornam permanentes, podem induzir uma alteração das funções celulares e uma proliferação descontrolada que leva à carcinogênese. Finalmente, quando o impacto do contaminante é observado durante a divisão celular, ele pode produzir uma mutação transmitida para as gerações futuras (BURCHAM 1999; VALAVANIDIS *et al.*, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2007; SOLÉ *et al.*, 2008).

Os danos ao DNA foram medidos segundo a metodologia descrita por GAGNÉ *et al.* (1995). As informações sobre as etapas realizadas estão apresentadas no item 8.4.2.

4.7.3 Quantificação de proteínas totais

O método baseado na reação com o reagente Coomassie Brilliant Blue G-250, proposto por BRADFORD (1976) é rápido e sensível para a quantificação de proteínas. A dosagem de proteínas pelo método de BRADFORD (1976) permite a quantificação da concentração de proteínas numa determinada amostra, uma vez que tal informação é necessária para a realização de outros biomarcadores. As etapas realizadas estão descritas no item 8.4.3.

4.7.4 Descrição das etapas realizadas

A fim de elucidar as etapas da metodologia realizadas no decorrer do presente estudo, a Figura 13 sumariza de forma ilustrativa as etapas, desde a coleta das amostras até a obtenção dos resultados.

Figura 13 – Fluxograma das etapas realizadas

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os corpos d'água contêm milhares de produtos químicos sobre os quais há pouca informação a respeito da ocorrência e faixas de concentração. Uma vez que grande parte desses compostos não é regulamentada, a identificação e caracterização quanto ao potencial de alteração endócrina não estão totalmente definidos (HERING *et al.*, 2010; MURRAY *et al.*, 2010).

Estudos recentes em vários países mostraram que a atividade estrogênica presente no ambiente aquático é capaz de causar distúrbios ambientais (KORTENKAMP, 2007; HUANG *et al.*, 2012; BERGMAN *et al.*, 2013; GOEPPERT *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2015). Acredita-se que os compostos passíveis de causar alteração endócrina atinjam os corpos hídricos principalmente por meio de efluentes domésticos e industriais. No entanto, a drenagem de áreas agrícolas também pode ser uma rota para tais compostos entrarem no sistema aquático.

Numerosas substâncias naturais e antropogênicas são conhecidas por apresentarem atividade estrogênica. No ambiente aquático, a atividade estrogênica é atribuída principalmente aos esteróides naturais, 17 β -estradiol (E2), estrona (E1) e estriol (E3), e ao estrogênio sintético, etinilestradiol (EE2) utilizado na formulação de contraceptivos. Em menor grau, produtos químicos (xenoestrógenos), como alquilfenóis, praguicidas e bisfenol A, também podem contribuir para a atividade estrogênica no meio aquático.

5.1 Atividade estrogênica em águas superficiais: BLYES

Os ensaios *in vitro* são considerados métodos de rastreio integrativos, rápidos, sensíveis e relativamente de baixo custo para estimar a atividade estrogênica total dos compostos que atuam no mesmo modo de ação (HILSCHEROVA *et al.*, 2000). Tais bioensaios são empregados para avaliar a atividade endócrina, incluindo atividade de hormônios andrógenos, progestógenos, tireóide e estrogênicos, em diferentes matrizes ambientais (LEUSCH *et al.*, 2017).

Dentre as diferentes matrizes ambientais, os efluentes de águas residuárias e águas superficiais são continuamente testados utilizando os bioensaios (BAIN *et al.*, 2014; SCHILIRO *et al.*, 2012; SCOTT *et al.*, 2014), bem como, a água potável que também é investigada quanto à presença de atividade endócrina (BRAND *et al.*, 2013; CONLEY *et al.*, 2017).

Dos ensaios *in vitro* que detectam a estrogenicidade, os de transativação são os mais utilizados, uma vez que avaliam a capacidade de amostras ambientais e produtos químicos em ligar-se a um receptor de estrogênio (KINNBERG, 2003). Além disso, os ensaios que

identificam atividade estrogênica são recomendados para uso em monitoramento de qualidade de águas (LEUSCH *et al.*, 2010). Um dos principais problemas na utilização de ensaios *in vitro* nas análises de amostras ambientais é a presença de substâncias citotóxicas. Os bioensaios com levedura são considerados os mais adequados para o monitoramento de amostras ambientais, considerando que as amostras possuem substâncias tóxicas e não-estrogênicas (DEPA, 2003).

Nesse contexto, o bioensaio BLYES conta com a utilização de uma linhagem de levedura para avaliação da citotoxicidade presente nas amostras, denominada BLYR. Esta linhagem foi desenvolvida em paralelo a BLYES para ser utilizada concomitantemente, e para que seja verificada a presença de compostos tóxicos, porém não estrogênicos presentes nas amostras (SANSEVERINO *et al.*, 2005).

A linhagem BLYR avalia a citotoxicidade por meio da redução de bioluminescência; os resultados das leituras da linhagem BLYR estão apresentados no item 8.5. Diversos estudos mostraram que a atividade estrogênica detectada em amostras ambientais por diferentes ensaios *in vitro* são úteis para o monitoramento ambiental (LEUSCH *et al.*, 2010; LEGLER *et al.*, 2002). Por ser uma ferramenta de triagem, o bioensaio *in vitro* BLYES é sugerido para uma investigação inicial quanto à presença de compostos estrogênicos em amostras ambientais.

Visando a proteção da biota aquática em águas superficiais, o presente estudo teve como objetivo principal a obtenção de informações quanto à presença de atividade estrogênica em rios e reservatórios do estado de São Paulo. Para tanto, foi utilizado o bioensaio *in vitro* BLYES, quantificando a atividade estrogênica total, e o emprego da linhagem BLYR na avaliação das amostras quanto à citotoxicidade. Na Figura 14 estão ilustradas as etapas correspondentes na análise das amostras e quanto a atividade estrogênica e/ou citotoxicidade. Os resultados das amostras de água superficial testadas utilizando o bioensaio BLYES estão apresentados na Tabela 3.

Figura 14 – Etapas de avaliação de amostras ambientais quanto à estrogenicidade e citotoxicidade

Tabela 3 – Resultados do BLYES (ng eq E2 L⁻¹) de acordo com as coletas bimestrais para os anos de 2015 e 2016

Locais de amostragem	2015						2016					
	Jan/Fev	Mar/Abr	Mai/Jun	Jul/Ago	Set/Out	Nov/Dez	Jan/Fev	Mar/Abr	Mai/Jun	Jul/Ago	Set/Out	Nov/Dez
<i>Reservatório Guarapiranga</i>	0,26	<0,10	<0,10	0,51	0,21	<0,10	<0,10	<0,10	0,23	<0,10	<0,10	<0,10
<i>Rio Jaguari</i>	<0,10	1,19	0,18	<0,10	<0,10	2,03	0,37	<0,10	2,71	1,07	1,23	0,50
<i>Rio Piracicaba</i>	1,00	<0,10	<0,10	1,84	1,18	<0,10	<0,10	<0,10	0,73	0,85	<0,10	<0,10
<i>Ribeirão Pires</i>	14,60	<0,10	0,80	4,81	2,07	9,88	5,13	8,15	10,75	4,36	2,21	1,01
<i>Ribeirão Grande</i>	1,36	<0,10	0,29	0,81	1,90	3,61	<0,10	0,64	2,09	0,92	*	1,67
<i>Rio das Araras</i>	3,28	0,37	7,31	5,46	2,73	<0,10	<0,10	*	2,37	0,14	1,34	0,56
<i>Reservatório Cascata</i>	<0,10	<0,10	<0,10	*	0,16	<0,10	<0,10	1,23	<0,10	0,65	<0,10	0,13
<i>Reservatório do Jaguari</i>	<0,10	<0,10	<0,10	2,08	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
<i>Rio Sapucaí-Guaçu</i>	3,44	2,76	<0,10	4,73	2,91	0,11	<0,10	4,20	2,49	0,23	0,79	0,67
<i>Rio São Miguel Arcanjo</i>	<0,10	<0,10	<0,10	*	<0,10	<0,10	<0,10	0,27	0,20	0,14	<0,10	<0,10

Limite de quantificação = <0,10 ng eq E2 L⁻¹; * = amostras não testadas

Utilizando bioensaios *in vitro*, as atividades biológicas combinadas da mistura de compostos estrogênicos podem ser quantificadas e expressas como nanograma equivalente por litro de um composto de referência (ng eq L⁻¹ - EEQ).

Isso permite que compostos desconhecidos sejam detectados por sua atividade e fornece relevância toxicológica (ou seja, atividade endócrina específica) da mistura presente na amostra em questão; além disso a sensibilidade e robustez dos métodos, tornam o uso de bioensaios *in vitro* muito adequado como uma ferramenta de triagem para a avaliação da atividade estrogênica em amostras de água (ESCHER *et al.*, 2011).

Os valores da atividade estrogênica medidos durante 2015 e 2016 variaram de 0,61 a 63,77 EEQ. O local com o menor valor medido foi o Rio São Miguel Arcanjo, e o local com o maior valor medido foi o Ribeirão Pires. A Figura 15 apresenta em forma de diagrama de caixa a ocorrência de atividade estrogênica de acordo com cada local estudado em todo o período.

Figura 15 – Distribuição dos valores da atividade estrogênica (ng eq E2 L⁻¹) de acordo com os locais estudados em 2015 e 2016

Na Figura 15 os diagramas de caixa representam a distribuição dos valores de atividade estrogênica medidos durante 2015 e 2016. A linha pontilhada (....) indica a média, a linha contínua representa a mediana, e as barras indicam os erros (percentil de confiança de 95%).

A atividade estrogênica medida nos rios e reservatórios do Estado de São Paulo durante a duração do presente estudo não apresentou tendência sazonal. Pode-se considerar que isso deve-se ao fato do ano de 2015 ser a recuperação da crise hídrica no Estado de São Paulo.

No ano de 2016 podemos observar que ocorre um decréscimo na atividade estrogênica nos meses chuvosos (Janeiro – Março; Outubro – Dezembro) em comparação aos meses com menor índices pluviométricos (Abril – Setembro); exceto no Ribeirão Pires, que manteve valores de atividade estrogênica acima de 1 EEQ durante todo o ano.

Os resultados de AE obtidos nos rios e reservatórios estudados assemelha-se aos resultados encontrados por RAO *et al.* (2013) em rios da China, onde os valores variaram de 5,72 a 59,06 EEQ; e no rio Paraíba do Sul no Estado do Rio de Janeiro onde a atividade estrogênica medida variou de 2,9 – 16 EEQ (DIAS *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos de atividade estrogênica amostras das águas superficiais no presente estudo foram mais altas em comparação com os países europeus e com o Japão, onde os valores da atividade estrogênica variaram de 0,30 – 4,50 EEQ na França; 0,3 – 7,0 EEQ na Suíça e 0,7 – 4,01 EEQ no Japão (CARGOUE *et al.*, 2004; VERMEIRSEN *et al.*, 2005; HASHIMOTO *et al.*, 2005).

De acordo com a Agência Ambiental da Inglaterra e País de Gales (2004), concentrações superiores a 1,0 EEQ obtidas nos ensaios *in vitro* são associadas a efeitos adversos em organismos utilizados nos ensaios *in vivo*. A definição deste valor foi devido às observações dos efeitos adversos causados pelo composto de referência padrão (E2) em concentrações superiores a 1 ng L⁻¹ (EA, 2004).

No artigo de JAROŠOVÁ *et al.* (2014) foram derivadas concentrações seguras de EEQ para efluentes domésticos tratados considerando que os esteróides estrogênicos são responsáveis por mais de 90% da estrogenicidade de águas residuais, e que esses compostos são altamente potentes *in vivo*, principalmente o EE2.

Os valores seguros de EEQ foram calculados após a realização de bioensaios *in vitro* utilizando a concentração prevista de não causar efeito (PNEC) para as substâncias consideradas representativas quanto à estrogenicidade. Os critérios para os valores seguros foram divididos em longo período de exposição *in vivo* (0,1 – 0,4 EEQ) e curto período de exposição *in vivo* (0,5 – 2 EEQ).

5.2 Avaliação dos efeitos *in vivo* utilizando o test FET

Os ensaios *in vitro* são amplamente utilizados na determinação da atividade estrogênica. Porém, não é possível avaliar diretamente os riscos ambientais pela medida *in vitro* da atividade estrogênica, uma vez que a potência dos estrogênios individuais pode diferir entre as repostas dos ensaios *in vitro* e *in vivo* (EA, 2004).

Além disso, existem efeitos estrogênicos baseados em diferentes mecanismos de ação. Para fornecer uma informação confiável sobre a atividade estrogênica, faz-se necessária a avaliação dos possíveis efeitos adversos, como por exemplo, a indução da vitelogenina em peixes machos (DEPA, 2003). Os efeitos adversos, incluindo os estrogênicos, são geralmente causados por misturas de diferentes produtos químicos, o que aumenta o risco para organismos não-alvo (WHO/UNEP, 2013).

Os ensaios ecotoxicológicos são empregados na avaliação de efeitos tóxicos. Dentre os diversos tipos de ensaios, destaca-se o teste que avalia a toxicidade utilizando embriões de peixe (FET). O teste FET foi originalmente desenvolvido para avaliação de efeitos em estágios embrionários de peixes após exposição às substâncias químicas.

De acordo com a Diretiva Européia 2010/63/UE, o *Danio rerio* nos estágios embrionários não têm alimentação independente, e nutrem-se com a reserva do vitelo; e como os organismos estão em processo de desenvolvimento, considera-se que nem a dor nem o desconforto podem ser percebidos.

Os efeitos ambientais da exposição são considerados mais severos durante os períodos de desenvolvimento, podendo inclusive ser transgeracionais (SUTTON *et al.*, 2018). O *Danio rerio* pode ser empregado como um modelo *in vivo* para avaliar as interações biológicas, e é uma plataforma excepcional para detalhar os mecanismos pelos quais as substâncias provocam respostas biológicas específicas (TRUONG *et al.*, 2011).

Nesse contexto, o emprego do FET avaliou os efeitos adversos após exposição a amostras de água superficial com atividade estrogênica maior que 0,1 EEQ medida previamente com o BLYES. O FET avaliou efeitos letais e alterações morfológicas no desenvolvimento de embriões de *Danio rerio*. Na Figura 16 e na Figura 17 estão apresentados os efeitos observados nos organismos (n=120) após 96 horas de exposição as amostras de água superficial dos rios estudados quanto à presença de atividade estrogênica. Os efeitos biológicos medidos não são relacionados com a AE medida pelo BLYES. Porém, indicam os efeitos causados pela mistura de substâncias presentes nas águas superficiais do Estado de São Paulo, mesmo que em baixas concentrações ($\mu\text{g} - \text{ng L}^{-1}$).

Figura 16 – Efeitos observados nos embriões de *Danio rerio* após exposição às amostras de água superficial dos rios estudados acordo com os locais de amostragem durante 2015 e 2016

No presente estudo, os maiores números de efeitos no desenvolvimento dos embriões de *zebrafish* foram observados nas amostras de água superficial referentes aos rios: Jaguari, Piracicaba, Ribeirão Grande e Ribeirão Pires. Uma vez que o desenvolvimento é altamente coordenado, a exposição à xenobióticos durante esse período pode provocar a interrupção do desenvolvimento, levando à morte do organismo (SUPATTO *et al.*, 2011).

A exposição a substâncias citogenotóxicas ou de ação endócrina podem causar efeitos adversos mesmo em concentrações muito baixas (SILVA *et al.*, 2002). Muitas substâncias chegam ao meio ambiente, e os organismos estão cronicamente expostos a esses produtos químicos; assim deve-se considerar os efeitos causados pela exposição de misturas (SCHMIDT *et al.*, 2016).

Rios e reservatórios possuem características completamente distintas, e pode-se observar que os efeitos biológicos medidos, bem como a ocorrência de atividade estrogênica é diferente. De todos os locais amostrados, apenas o reservatório Jaguari não teve qualquer amostra acima de 0,1 EEQ (exceto a amostra referente Jul/Ago de 2015), portanto, não foram avaliados efeitos biológicos utilizando o FET. Os resultados observados após a exposição as amostras dos reservatórios Guarapiranga e Cascata estão apresentadas na Figura 17.

Figura 17 - Efeitos observados nos embriões de *Danio rerio* após exposição às amostras de água superficial dos reservatórios durante 2015 e 2016

As amostras do reservatório Guarapiranga testadas no FET foram referentes ao ano de 2015, pois em 2016 não se observou AE ao longo do ano. Já o reservatório Cascata só teve amostras testadas referentes ao ano de 2016.

Apesar dos efeitos estrogênicos não serem avaliados no FET, uma vez que a atividade estrogênica afeta a reprodução ou causa alterações ligadas ao sistema reprodutivo, observou-se que algumas das amostras com os valores mais altos em EEQ apresentaram efeitos adversos no desenvolvimento dos embriões.

A Figura 18 apresenta a porcentagem de alterações morfológicas observadas no FET, considerando o número de amostras com AE >0,10 EEQ, onde observou-se que as amostras com maior atividade estrogênica medida pelo BLYES também foram as que apresentaram mais efeitos sub-letais nos organismos. Sugerindo que as substâncias presentes nas amostras podem interagir, acarretando em uma mistura complexa que passível de provocar efeitos adversos nos embriões.

Figura 18 – Taxa de alterações morfológicas (%) no FET em comparação com atividade estrogênica medida no BLYES

Em relação aos efeitos agudos, observou-se a maior taxa de letalidade nas amostras referentes ao Ribeirão Pires (19,2%), seguido do Ribeirão Grande, Piracicaba e Sapucaí-Guaçu, conforme apresentado na Figura 19.

Figura 19 – Taxa de letalidade (%) no FET

Segundo LIU *et al.* (2012), organismos aquáticos, nos estágios iniciais da vida, são sensíveis ao estrogênio na exposição aguda. Os estágios embrionários e juvenil de organismos aquáticos têm sido utilizados para avaliar a qualidade do meio ambiente aquático devido à menor tolerância a substâncias tóxicas em comparação com a fase adulta.

Os resultados obtidos no presente estudo, mostram que com o emprego do bioensaio FET, os efeitos biológicos podem ser mensurados e avaliados. Sugerindo melhor conduta no monitoramento ambiental de áreas que recebem descargas de substâncias químicas e não são completamente removidas pelo tratamento convencional, expondo a biota local aos contaminantes.

Como uma ferramenta utilizada em estudos de “*early warning*” os biomarcadores são sugeridos para avaliar possíveis efeitos moleculares que podem se somar de forma cumulativa ou integrativa a um nível em que possíveis efeitos subletais ou letais possam ocorrer (SCHMIDT *et al.*, 2016). Diversos mecanismos de ação ocorrem em nível molecular, como por exemplo, o estresse oxidativo ou mesmo danos ao DNA.

Nas amostras do FET onde não se observaram efeitos letais ou alterações morfológicas, foram avaliados os efeitos em nível molecular utilizando alguns biomarcadores, conforme apresentado no item 8.4. Uma vez que, os compostos presentes nas amostras são heterogêneos, foram escolhidas ferramentas menos específicas, capazes de avaliar os efeitos da mistura dos contaminantes nas amostras de água superficial.

5.3 Biomarcadores: danos ao DNA e peroxidação lipídica em embriões de zebrafish

Diversos estudos mostraram que os níveis de peroxidação lipídica podem ser afetados por poluentes ambientais pertencentes a diferentes classes (DAMIENS et al., 2007; AÏT ALLA et al. 2006; COSSU et al. 2000; GIGUÈRE et al. 2003).

A utilização dos biomarcadores em avaliações de qualidade ambiental permite prever efeitos mais severos, utilizando a medição de alterações em níveis moleculares. Porém, é necessária uma integração com outras técnicas a fim de complementar os efeitos medidos pelos diferentes biomarcadores.

O presente estudo analisou alterações em nível sub-celular nos organismos previamente expostos às amostras de água superficial onde não se observou efeito letal ou no desenvolvimento. Para uma análise geral de possíveis perturbações causadas pela exposição da mistura de contaminantes presentes em amostras ambientais, foi escolhida a avaliação dos danos ao DNA e a peroxidação lipídica (LPO).

Os resultados dos biomarcadores de danos ao DNA mostrados na Figura 20 e na Figura 21 são os valores médios das replicatas das amostras. Foi analisado um pool de organismos (n=120) após exposição as amostras de água superficial por 96 horas.

Figura 20 - Resultados dos danos ao DNA medidos em embriões de zebrafish após exposição às amostras de 2015

Os resultados obtidos indicam que nas amostras testadas existem contaminantes que podem interferir no metabolismo dos organismos aquáticos. Estes contaminantes (mesmo que em baixas concentrações; $\mu\text{g} - \text{ng L}^{-1}$) podem levar a efeitos em níveis mais severos com maior tempo de exposição ou alterações e mistura entre os compostos, incluindo a possibilidade de ocorrer efeitos sinérgicos.

As lesões no DNA, se não forem reparadas, podem iniciar uma cascata de efeitos biológicos a níveis celulares, teciduais, de todo o organismo e, eventualmente, nos níveis populacionais e de comunidade (WIRGIN & WALDMAN, 1998; THEODORAKIS, 2001; LEE et al., 2003; CHEN et al., 2004). Na Figura 21 são mostrados os resultados do biomarcador avaliando danos no DNA em embriões de zebrafish expostos às amostras de 2016.

Figura 21 - Resultados dos danos ao DNA medidos em embriões de zebrafish após exposição às amostras de 2016

Diversos estudos já reportaram que poucas horas de exposição a xenobióticos podem levar a efeitos no DNA, porém, tais danos podem ser reparados caso a exposição seja interrompida (VIGNARD et al., 2013; CHÂTEL et al., 2015). Danos no DNA podem gerar vários efeitos negativos no organismo, tais como mutações, alterações cromossômicas ou

carcinogênese, comprometendo a reprodução e sobrevivência do organismo (MORACHIS-VALDEZ et al., 2015).

Devido ao fato que as concentrações presentes nas amostras estão na ordem de ng L^{-1} devem ser consideradas as alterações espontâneas que ocorrem no DNA. O que explica valores de DNA danificado/ mg de proteínas no controle.

No entanto, no cenário de exposição a amostras ambientais, onde os compostos são introduzidos continuamente no ambiente, os efeitos em níveis moleculares podem se estender aos níveis mais complexos de organização biológica (indivíduo). Tal fato justifica a utilização de biomarcadores na avaliação de efeitos em níveis sub-indivíduo em programas de monitoramento ambiental.

Além das alterações no DNA, falhas no mecanismo de defesa antioxidante causadas pela exposição aos poluentes, seja por inibição ou excesso de radicais livres, podem perturbar o equilíbrio entre o sistema antioxidante e pró-oxidante, o que pode promover o estresse oxidativo, e resultar no aumento da peroxidação lipídica (MILAN et al., 2013).

De acordo com AGUIRRE-MARTÍNEZ et al. (2013) contaminantes presentes no meio ambiente estão envolvidos na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), e são capazes de causar efeitos adversos em organismos não alvo, além de alterar o estado oxidativo das células durante o metabolismo dos xenobióticos.

As EROs podem ser produzidas por diversos compostos, como por exemplo os interferentes endócrinos e outros compostos emergentes; e após os processos metabólicos, geram produtos reativos capazes de induzir estresse oxidativo, e causar alterações como a peroxidação lipídica, alterações na expressão gênica, danos no DNA, entre outros (DINIZ et al., 2015).

Na Figura 22 estão apresentados os resultados das análises de peroxidação lipídica em embriões de zebrafish após 96h de exposição às amostras de água superficial. Das amostras analisadas, as que apresentaram peroxidação lipídica medida mais altas foram o rio Araras (abril, 2015), Ribeirão Grande (março, 2016) e o rio Piracicaba (julho, 2016).

Tanto os danos no DNA quanto a peroxidação lipídica podem ser relacionados a alterações no sistema de defesa antioxidante dos organismos aquáticos, possivelmente causados pela exposição aos contaminantes (CHEUNG et al., 2001).

Os biomarcadores empregados no presente estudo foram responsivos aos contaminantes presentes nas amostras ambientais, porém não foi possível elucidar quais substâncias causam as

alterações encontradas. Cabe salientar que os biomarcadores utilizados no presente estudo (peroxidação lipídica e danos no DNA) avaliam alterações citogenotóxicas.

Figura 22 – Resultados da análise de peroxidação lipídica (LPO) em embriões de zebrafish após exposição às amostras de 2015 (esquerda) e 2016 (direita)

5.4 Proposta de categorização da atividade estrogênica medida no BLYES

Na literatura são escassos os estudos que relacionam a atividade estrogênica quantificada por bioensaios *in vitro* com as respostas biológicas *in vivo*. De acordo com LEUSCH *et al.* (2010), são necessárias mais pesquisas para que seja possível uma avaliação dos efeitos adversos para a definição de níveis de atividade estrogênica que permitam a priorização dos locais a serem investigados.

De acordo com KASE *et al.* (2018) a utilização de bioensaios *in vitro* no estudo dos compostos estrogênicos e seus efeitos destaca-se, pois, essa ferramenta bioanalítica pode:

- Quantificar a atividade estrogênica em amostras de águas superficiais e residuais,
- Detectar o efeito combinado de misturas e,
- Permitir uma avaliação ecotoxicológica utilizando valores de desencadeamento de efeitos (*trigger values*) para calcular quocientes de risco, fornecendo uma avaliação integrada da mistura.

Diversas ferramentas bioanalíticas baseadas em efeitos, são atualmente empregadas na avaliação do risco ecológico de misturas e substâncias individuais, conforme demonstrado em diversos estudos (VAN DER OOST *et al.*, 2003; BRAND *et al.*, 2013; PUSCEDDU, 2017).

A maioria dos ensaios *in vivo* avalia os efeitos em organismos inteiros, como por exemplo: crescimento, reprodução, atividade de alimentação e mortalidade; enquanto a maioria dos ensaios *in vitro* (linhagens celulares ou organismos unicelulares) mede efeitos bioquímicos específicos de compostos, como por exemplo: desregulação endócrina e genotoxicidade (VAN DER OOST *et al.*, 2017). Os ensaios *in vivo* são largamente empregados na avaliação de toxicidade de amostras ambientais, pois respondem à presença dos poluentes presentes na amostra ambiental, e a transferência dos mesmos para o organismo.

Ensaio baseado em efeitos (EBM), principalmente *in vitro*, e bioensaios utilizando organismos inteiros *in vivo* (como algas, dafnídeos e embriões de peixes) têm sido aplicados há décadas para monitorar a qualidade e os processos de tratamento da água (ESCHER & LEUSCH, 2012; LEUSCH & SNYDER, 2015). No entanto, atualmente as análises químicas direcionadas ainda são mais comuns em aplicações no monitoramento de qualidade da água (ESCHER *et al.*, 2018).

De acordo com BRACK *et al.* (2017), o uso de bioensaios foi recomendado para uma revisão quanto aos aspectos regulatórios de qualidade das águas. Uma vez que a caracterização química direcionada não pode explicar os efeitos causados pela presença de múltiplas substâncias químicas e produtos de transformação.

Além do fato que no ambiente aquático as substâncias químicas estão associadas e podem formar misturas complexas. Portanto, mesmo que as concentrações das substâncias individuais estejam abaixo dos valores de referência, os efeitos das misturas dessas substâncias não podem ser quantificados quimicamente (SILVA *et al.*, 2002; WALTER *et al.*, 2002). Nesse contexto, os bioensaios fornecem evidências do efeito biológico conjunto da mistura das substâncias presentes em uma amostra (MALETZ *et al.*, 2013; VÄLITALO *et al.*, 2016).

No artigo publicado por ESCHER *et al.* (2018) foi apresentado um método indicando o risco aceitável para misturas complexas à medida que ocorrem em águas superficiais; com o propósito de mensurar os valores de desencadeamento baseados em efeitos biológicos (EBT, *effect-based trigger value*). Na avaliação de risco ambiental, os EBTs são utilizados para priorizar os locais onde os maiores riscos ecológicos podem ser esperados.

A derivação dos valores de EBT emergiu como uma ferramenta para interpretar e classificar as respostas observadas nos bioensaios (VAN DER OOST *et al.*, 2017; ESCHER *et al.*, 2017; JAROŠOVÁ *et al.*, 2014).

Os valores de EBT para os bioensaios *in vitro* podem ser derivados combinando uma abordagem baseada em equivalentes tóxicos (TEQs) ou *Bioanalytical Equivalent Concentrations* (BEQs) de substâncias selecionadas que desencadeiam os efeitos específicos avaliados nos bioensaios, e informações de dados químicos, toxicológicos e biológicos, quando disponíveis.

É impossível obter valores de desencadeamento de efeito aplicáveis que sejam seguros para todos os organismos aquáticos, considerando uma fauna altamente diversificada e com sensibilidades distintas entre si. Portanto, no trabalho publicado por VAN DER OOST *et al.* (2017) uma abordagem mais realista foi aplicada para derivar valores de EBT de “baixo risco”.

Estes valores específicos de EBT não protegem todos os organismos aquáticos contra os efeitos adversos, mas os valores que extrapolam o que foi derivado indicam riscos elevados para o ecossistema aquático atribuível à mistura dos poluentes presentes. Para aplicações de monitoramento ambiental, é requerido definir limiares que categorizam a água como aceitável ou não aceitável em relação aos contaminantes presentes; com testes adicionais recomendados caso uma amostra de água exceder o EBT proposto (ESCHER *et al.*, 2018).

Os valores de EBTs para águas superficiais precisam estar em consonância com os padrões de qualidade relacionados com a saúde humana para compostos individuais. Consequentemente, tais valores precisam ser protetivos tanto para a saúde ambiental, quanto humana devido aos diversos usos das águas superficiais.

O valor de EEQ-SSE (concentração de EEQ que é segura aos principais Estrogênios Esteróides) sugerido para efluentes foi de 0,3 ng L⁻¹ para longo período de exposição e de 1,4 ng L⁻¹ para curto período de exposição (JAROŠOVÁ *et al.*, 2014).

Os valores de EEQ-SSEs para estações de tratamento de efluentes domésticos e para águas superficiais coletadas próximo às descargas desses efluentes propostos na revisão de JAROŠOVÁ *et al.* (2014) estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Equivalentes estrogênicos seguros em relação aos estrogênios esteróides (EEQ-SSE) calculados para diferentes bioensaios *in vitro* em estações de tratamento de efluentes domésticos e rios próximos às suas descargas

Bioensaio	EEQ-SSE (ng L ⁻¹ EEQ)	
	Longo período de exposição	Curto período de exposição
YES (AERNI <i>et al.</i> , 2004; RUTISHAUSER <i>et al.</i> , 2004)	0,3	1,7
YES (SVENSON <i>et al.</i> , 2003)	0,4	2,0
YES (CALDWELL <i>et al.</i> , 2012)	0,3	1,6
YES (LEUSCH <i>et al.</i> , 2010)	0,2	1,2
ER-CALUX (SONNEVELD <i>et al.</i> , 2006)	0,2	0,6
ER-CALUX (AVBERSEK <i>et al.</i> , 2011)	0,4	2,0
ER-CALUX (HOUTMAN <i>et al.</i> , 2004)	0,3	1,4
MELN (LEUSCH <i>et al.</i> , 2010)	0,2	0,8
MELN (LEUSCH <i>et al.</i> , 2010)	0,3	1,6
E-screen (GUTENDORF & WESTENDORF, 2001)	0,1	0,5
E-screen (DREWES <i>et al.</i> , 2005)	0,3	1,6
E-screen (LEUSCH <i>et al.</i> , 2010)	0,3	1,1
E-screen (LEUSCH <i>et al.</i> , 2010)	0,1	0,5
MVLN (GUTENDORF & WESTENDORF, 2001)	0,1	0,5
Valor Mínimo	0,1	0,5
Valor Médio	0,2	1,2
Valor Máximo	0,4	2,0

As EEQ-SSEs derivadas para cenários de exposição em longo prazo são mais protetivas e devem ser utilizadas na maioria dos casos; as EQ-SSEs para exposições em curto prazo podem ser utilizadas em casos específicos quando as amostras são coletadas durante períodos curtos de

concentrações mais elevadas em EEQ (por exemplo, durante escoamentos excessivos de esgotos ou durante períodos de seca, onde os rios acabam tendo uma concentração mais alta de efluentes pela ausência de chuvas) (ANDERSON *et al.*, 2012).

Os valores EEQ-SSEs sugeridos consideram que a maior parte da estrogenicidade medida é proveniente dos principais estrógenos (E1, E2, E3 e EE2). Como as PNECs *in vivo* para muitos compostos estrogênicos ainda não foram determinadas, mais pesquisas são necessárias para avaliar a aplicabilidade de valores de EEQ-SSEs para as amostras em que os estrogênios esteróides não são dominantes.

Considerando que todos os ensaios de estrogenicidade *in vitro* avaliados possuem um mecanismo específico de ação e que geralmente há compostos com diferentes modos de ação que podem induzir efeitos similares *in vivo* (por exemplo, distúrbios da reprodução), o principal objetivo da derivação de EEQ-SSEs não é propor um valor orientador, mas sim compreender melhor os resultados *in vitro* em relação aos efeitos *in vivo* (JAROŠOVÁ *et al.*, 2014).

De acordo com ESCHER *et al.* (2018) os valores de EBT para alguns bioensaios como os de estrogenicidade já poderiam ser implementados em regulamentação com as informações obtidas até o presente momento. A derivação do valor de EBT para estrogenicidade foi realizada com base nas informações disponíveis sobre os valores orientadores para hormônios estrógenos; e a abordagem adotada foi usar os valores de BEQs para obter o EBT. Na derivação de valores de EBT existem duas principais abordagens:

- (i) Quando o ponto de partida é um efeito adverso, faz-se necessário inferir concentrações de substâncias químicas de referência que são consideradas seguras para organismos *in vivo* para concentrações detectáveis *in vitro*.

Tal abordagem não leva em consideração as misturas; porém, as misturas podem ser incluídas uma vez que os bioensaios são capazes de quantificar os efeitos de diversas substâncias em uma amostra.

- (ii) Derivar um EBT a partir das informações de concentrações onde não se observam efeito (NOEC) e/ou mínima concentração onde se observa um efeito (NOAEL) seguidos de uma série de extrapolações (ESCHER *et al.*, 2018).

No trabalho realizado KUNZ *et al.* (2015), para derivar um valor de EBT para estrogenicidade em águas superficiais, foi aplicado um valor de segurança de uma substância de referência em BEQ e consequentemente aplicou-se esse valor como EBT.

Justifica-se no modelo proposto considerar a estrogenicidade medida nos diferentes bioensaios como majoritariamente pertencente aos estrógenos mais potentes (E1, E2, E3 e EE2). Se forem aplicadas ferramentas bioanalíticas para a avaliação da qualidade da água, deve-se decidir qual resposta de bioensaio é considerada como indicativa de risco ambiental. Para este propósito, um conjunto de valores de EBT diferencia entre:

- (a) O baixo risco de efeitos adversos à saúde se as respostas do bioensaio estiverem abaixo do EBT, e
- (b) O risco potencial de efeitos adversos à saúde se as respostas do bioensaio excederem o EBT (VAN DER OOST *et al.*, 2017).

Na derivação do valor de EBT para estrogenicidade, VAN DER OOST *et al.* (2017) consideraram a toxicidade de compostos estrogênicos, incluindo *endpoints* de biomarcadores (produção de vitelogenina e alterações na expressão gênica) relatados em muitos estudos, sendo os peixes os organismos considerados mais sensíveis aos efeitos estrogênicos.

O BEQ foi derivado de uma concentração de 3,3 ng L⁻¹ para indução de vitelogenina em truta arco-íris (*O. mykiss*) após exposição crônica à estrona, onde foi proposto um BEQ seguro de 0,0066 ng EEQ L⁻¹. Após os dados de toxicidade serem convertidos em concentrações de BEQ dos compostos de referência dos bioensaios, VAN DER OOST *et al.* (2017) obtiveram o EBT para atividade de ER-CALUX de 0,5 ng EEQ L⁻¹.

Na derivação das faixas de valores para o BLYES será utilizado como EBT o valor derivado para o ER-CALUX. Os critérios utilizados para a proposta das faixas de valores foram as observações dos resultados dos ensaios FET, sendo que o número de efeitos no desenvolvimento e/ou letalidade foram considerados na determinação da faixa de valores de EBT para categorizar os resultados do BLYES.

Apesar da maioria das publicações disponíveis na literatura ser realizadas com as linhagens de ER-CALUX, outros bioensaios foram comparados para que as derivações e extrapolações fossem factíveis para todas ferramentas bioanalíticas disponíveis atualmente.

A definição do EBT foi baseada na linhagem ER-CALUX em comparação com a linhagem do bioensaio YES (JAROŠOVÁ *et al.* 2014), que é diretamente comparável ao BLYES (SANSEVERINO *et al.* 2005). Portanto, justifica-se que os valores propostos têm embasamento em publicações anteriores que validaram a sensibilidade do BLYES em comparação com outros bioensaios *in vitro* disponíveis.

Os resultados em EEQ obtidos no bioensaio *in vitro* BLYES foram comparados com os efeitos em organismos vivos empregando o FET teste. Em complemento, foram realizadas análises químicas dos compostos de interesse (hormônios, praguicidas, cafeína, etc).

O modelo proposto sugere que a integração de bioensaios *in vitro*, análise de efeitos *in vivo* e caracterização química de amostras de água, possa fornecer informações mais completas, e elucidar quanto ao entendimento dos efeitos causados pela mistura.

Propondo assim, a derivação de faixas de concentrações em EBT para os valores em EEQ obtidos pelo BLYES. E quando os resultados das amostras em EEQ estiverem fora do EBT proposto, outros ensaios (químicos e/ou biológicos, como os citados anteriormente) podem ser utilizados como complemento à avaliação ambiental e contribuir na tomada de decisão quanto ao risco ecológico.

Observou-se que as amostras testadas no BLYES com resultados de até 1,0 EEQ tiveram mais de 90% de organismos normais, ou seja, sem qualquer tipo de efeito, seja no desenvolvimento ou letalidade de acordo com o teste FET. No intervalo de 1,0 a 4,0 EEQ foram observados efeitos significativos no desenvolvimento dos organismos, e a sobrevivência foi de 65%. Em amostras com valores maiores que 4,0 EEQ observou-se uma taxa de sobrevivência de 55%, porém, com aumento no número de efeitos agudos.

Cabe salientar que os valores propostos foram baseados nos dados da literatura para derivações e propostas de categorização da estrogenicidade com outras ferramentas bioanalíticas; e as faixas de EBT para enquadramento dos resultados do BLYES foram definidas por meio de bioensaio *in vivo* avaliando alterações no desenvolvimento de organismo representativo do ecossistema aquático. Considerando tais informações, a proposta para categorização do BLYES foi definida conforme ilustrado abaixo:

BLYES	Categorização (EBT)
$\leq 1,0$ EEQ	$< 2x$ EBT
$1,0 < EEQ \leq 4,0$	De $2x$ a $8x$ EBT
$> 4,0$ EEQ	$> 8x$ EBT

De acordo com a proposta de categorização apresentada no presente estudo, sugere-se que os valores para estrogenicidade $\leq 1,0$ EEQ não necessitam de nenhuma ação. Para os resultados que compreendem a faixa de 1,0 a 4,0 EEQ, sugere-se uma investigação mais aprofundada, com bioensaios *in vivo* e caracterização química das amostras.

Para os resultados no BLYES onde se obteve um valor maior que 4,0 EEQ sugere-se que as autoridades ambientais locais tomem uma ação de investigação e entendimento das causas da estrogenicidade medida nesses locais. Os critérios adotados na repetição de resultados correspondentes à cada faixa de EBT para fins regulatórios cabe as agências de fiscalização ambiental. A Tabela 5 apresenta os resultados do BLYES do período de 2015 e 2016 de acordo com a categorização proposta para faixas da estrogenicidade em águas superficiais do Estado de São Paulo.

Tabela 5 – Resultados do BLYES (EEQ) apresentados de acordo com a categorização baseada no EBT derivado para estrogenicidade

Locais de amostragem	2015						2016					
	Jan/Fev	Mar/Abr	Mai/Jun	Jul/Ago	Set/Out	Nov/Dez	Jan/Fev	Mar/Abr	Mai/Jun	Jul/Ago	Set/Out	Nov/Dez
<i>Reservatório Guarapiranga</i>	0,26	<0,10	<0,10	0,51	0,21	<0,10	<0,10	<0,10	0,23	<0,10	<0,10	<0,10
<i>Rio Jaguari</i>	<0,10	1,19	0,18	<0,10	<0,10	2,03	0,37	<0,10	2,71	1,07	1,23	0,50
<i>Rio Piracicaba</i>	1,00	<0,10	<0,10	1,84	1,18	<0,10	<0,10	<0,10	0,73	0,85	<0,10	<0,10
<i>Ribeirão Pires</i>	14,60	<0,10	0,80	4,81	2,07	9,88	5,13	8,15	10,75	4,36	2,21	1,01
<i>Ribeirão Grande</i>	1,36	<0,10	0,29	0,81	1,90	3,61	<0,10	0,64	2,09	0,92	*	1,67
<i>Rio das Araras</i>	3,28	0,37	7,31	5,46	2,73	<0,10	<0,10	*	2,37	0,14	1,34	0,56
<i>Reservatório Cascata</i>	<0,10	<0,10	<0,10	*	0,16	<0,10	<0,10	1,23	<0,10	0,65	<0,10	0,13
<i>Reservatório do Jaguari</i>	<0,10	<0,10	<0,10	2,08	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
<i>Rio Sapucaí-Guaçu</i>	3,44	2,76	<0,10	4,73	2,91	0,11	<0,10	4,2	2,49	0,23	0,79	0,67
<i>Rio São Miguel Arcanjo</i>	<0,10	<0,10	<0,10	*	<0,10	<0,10	<0,10	0,27	0,20	0,14	<0,10	<0,10

Limite de quantificação = <0,10 ng eq E2 L⁻¹; * = amostras não testadas; () EEQ ≤ 2x EBT; () EEQ > 2x e ≤ 8x EBT; () EEQ > 8x EBT.

5.5 Caracterização química das amostras ambientais

A diretiva de qualidade de água (WFD) na Europa visa integrar informações de ensaios biológicos e químicos para obter uma visão geral sobre a qualidade da água. De acordo com a diretiva, a caracterização química da água pode ser determinada analisando as concentrações de 45 grupos de substâncias prioritárias; considerando a água em boa qualidade quando as concentrações de todas as substâncias prioritárias estão abaixo da média anual e da concentração máxima admissível (EUROPEAN PARLIAMENT AND EUROPEAN COUNCIL, 2000).

A análise química de todos os compostos com potencial atividade estrogênica seria muito dispendiosa; além do que, compostos estrogênicos ainda não conhecidos, incluindo seus metabólitos, podem estar presentes em matrizes ambientais e não serem identificados (DEPA, 2003).

Com a combinação dos dois tipos de análise (biológica e química), é possível avaliar a atividade estrogênica em uma amostra, avaliar os efeitos da mistura de substâncias em organismos não-alvo, identificar (parcialmente) e quantificar os compostos responsáveis pela atividade estrogênica medida e possivelmente pelos efeitos biológicos observados, uma vez que pode ocorrer interação entre compostos.

No presente estudo, foram selecionadas substâncias pertencentes ao grupo dos praguicidas, hormônios, e alguns compostos químicos industriais para análise utilizando a técnica LC-MS/MS. A escolha dos compostos partiu da lista da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) no programa de *screening* de substâncias potencialmente estrogênicas (USEPA, 2012) e da Diretiva 2015/495 da Comissão Europeia, que estabeleceu uma lista de vigilância das substâncias para o acompanhamento da União no domínio da política da água nos termos da Diretiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu (EC, 2012).

A lista de vigilância europeia inclui o 17 α -etinilestradiol (EE2), 17 β -estradiol (E2) e a estrona (E1), com as concentrações anuais máximas permitidas de 3,6 ng E1 L⁻¹, 0,4 ng E2 L⁻¹ e 0,035 ng EE2 L⁻¹ (EC, 2012; KASE *et al.*, 2018).

Na ausência de regulamentação dos IEs, estudos identificaram substâncias com potencial estrogênico que em concentrações ambientalmente relevantes podem apresentar riscos para biota. Visando a proteção da saúde humana e ambiental, a Diretiva Qualidade Ambiental (2008/105/CE e 2013/39/UE) estabeleceu uma lista com 41 poluentes químicos com potencial de alteração do sistema endócrino (VANDERMARKEN *et al.*, 2018).

O monitoramento desses compostos é difícil, pois, os limites de detecção da maioria dos métodos analíticos disponíveis não conseguem determinar as concentrações necessárias para atender aos critérios de qualidade ambientais propostos (KASE *et al.*, 2018).

No presente estudo, além das análises das substâncias possivelmente estrogênicas, a cafeína foi analisada em todas as amostras de água superficial, uma vez que essa substância é considerada um indicador de atividade antrópica podendo relacionar a sua presença à de esgoto doméstico (JARDIM *et al.*, 2012).

As questões que surgem sobre o impacto dos interferentes endócrinos nos ecossistemas são justificadas devido à sua descarga difusa e contínua no meio aquático (VANDERMARKEN *et al.*, 2018). De acordo com DÍAZ-CRUZ *et al.* (2009) apesar de estarem presentes em concentrações geralmente baixas (ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$), a preocupação contínua com os IEs no meio ambiente é explicada pelo fato desse grupo heterôgeneo de substâncias possuir características pseudo-persistentes.

O desenvolvimento e validação dos métodos analíticos foi realizado por MONTAGNER *et al.* (2014), e as informações dos compostos analisados foram descritas previamente na Tabela 2. Todos os brancos estiveram abaixo do LQ em todas as amostras analisadas.

Na Tabela 6 está apresentada a faixa de concentrações das substâncias quantificadas de acordo com os locais de amostragem durante todo o período. Os compostos quantificados por LC-MS/MS de acordo com os locais amostrados durante 2015 e 2016 estão apresentados na Figura 23.

A quantificação dos compostos está demonstrada na forma de diagrama de caixa, sendo as linhas horizontais 25% (primeiro quartil), 50% (mediana) e 75% (terceiro quartil) dos valores; e as barras indicam os limites inferior e superior, e as linhas pontilhadas representam a média dos valores.

Tabela 6 – Faixa de concentração (ng L⁻¹), ocorrência dos compostos nos locais amostrados (%), e frequência (%) dos compostos quantificados em amostras de águas superficiais do Estado de São Paulo utilizando LC-MS/MS em 2015 e 2016

Classes	Substância	Faixa de concentração (ng L ⁻¹)		Média (ng L ⁻¹)	Mediana (ng L ⁻¹)	LQ (ng L ⁻¹)	Ocorrência (%) nos locais amostrados	Frequência de quantificação (%)
		Mínima	Máxima					
Estimulante	<i>Cafeína</i>	5,50	69.585,50	8380,03	1196,02	1,80	100	95
Fungicida	<i>Carbendazim</i>	4,72	284,93	34,67	25,16	4,72	60	85
	<i>Azoxistrobina</i>	2,75	3,10	2,93	2,93	2,12	100	4
	<i>Tebuconazole</i>	0,50	13,51	2,21	0,50	0,39	100	35
	<i>Fipronil</i>	1,02	3,95	1,47	1,38	1,02	70	13
Inseticida	<i>Carbofurano</i>	1,70	107,38	17,23	1,25	1,69	60	9
	<i>Malation</i>	3,10	54,50	11,87	11,00	0,69	100	49
	<i>Imidacloprida</i>	2,71	46,00	13,44	12,50	2,71	50	22
	<i>Simazina</i>	0,50	43,53	7,61	0,43	0,49	60	15
Herbicida	<i>Hexazinona</i>	0,45	41,00	8,01	1,30	0,33	90	27
	<i>Tebutiuron</i>	9,85	229,00	28,78	13,63	4,72	60	37
	<i>Ametrina</i>	1,20	42,87	5,99	2,84	0,48	90	23
	<i>Atrazina</i>	3,10	85,64	17,58	16,00	0,72	100	32
	<i>Diuron</i>	26,00	134,06	29,83	16,53	11,72	40	39
	<i>Clomazona</i>	30,50	46,02	27,86	28,34	12,07	30	5
	<i>2,4-D</i>	1,35	260,72	33,21	26,12	1,19	60	44
	<i>Hidroxiatrazina</i>	16,89	298,34	87,92	28,50	1,56	70	29

Hormônio natural	<i>Estrona</i>	3,80	77,42	44,08	52,27	3,79	80	19
	<i>Estradiol</i>	26,58	56,52	32,28	30,57	4,64	100	24
	<i>Estriol</i>	5,95	224,38	87,68	91,51	1,07	80	17
Hormônio sintético	<i>Etinilestradiol</i>	50,31	67,61	57,91	57,86	6,59	100	28
Anti-bacteriano	<i>Triclosan</i>	5,60	7,20	6,35	6,25	3,63	10	3
Plastificante	<i>Bisfenol A</i>	6,53	1.300,44	114,81	55,90	6,51	100	50
Surfactante	<i>Octilfenol</i>	67,96	69,70	68,64	68,62	2,22	100	26
	<i>Nonilfenol</i>	57,64	59,17	58,24	58,22	1,64	100	24

Figura 23 – Concentração dos compostos quantificados em escala logarítmica nas amostras de água superficial de acordo com os locais amostrados

Rio Piracicaba

Rio Araras

Rio São Miguel Arcanjo

Rio Sapucaí-Guaçu

A peculiaridade das substâncias com capacidade de alteração endócrina é a diversidade de classes às quais elas pertencem, tal diversidade sugere que essas substâncias podem interagir com um grande número de receptores nucleares como análogos ou antagonistas (DIAMANTI-KANDARAKIS *et al.*, 2009). As concentrações quantificadas em amostras de água superficial

agrupando os compostos nas suas respectivas classes são mostradas na Figura 24 em forma de diagrama de caixa..

Figura 24 – Concentração dos compostos quantificados por classes de substâncias em escala logarítmica nas amostras de água superficial analisadas durante 2015 e 2016

A cafeína, conforme apresentado na Tabela 6, foi a substância com maior frequência de quantificação nas amostras; além de estar presente em todos os locais amostrados em concentrações ambientalmente relevantes.

A presença da cafeína em corpos hídricos é diretamente relacionada ao aporte de esgoto doméstico, uma vez que essa substância é utilizada mundialmente como um traçador de atividade antrópica; além de ser uma substância estável em condições ambientais variáveis, possui alta solubilidade e mobilidade, e baixa volatilidade na água (BAHLMANN *et al.*, 2012; BUERGE *et al.*, 2003; KURISSERY *et al.*, 2012).

Em águas brasileiras, diversos autores quantificaram cafeína em diferentes matrizes. RAIMUNDO (2011) encontrou concentrações de cafeína nos rios Atibaia e Capivari na faixa de 200,0 – 41800,0 ng L⁻¹, valores cerca de mil vezes mais altos que outros compostos emergentes quantificados nos mesmos mananciais.

OTOMO (2010) encontrou cafeína em águas brutas e tratadas da região do Rio Paraíba do Sul (Pindamonhangaba, Taubaté, São José dos Campos e Guararema), para água tratada as concentrações quantificadas estiveram na faixa de 84,0 – 381,0 ng L⁻¹ e para água bruta 220,0 – 632,0 ng L⁻¹.

No artigo de revisão da literatura publicado por MONTAGNER *et al.* (2017) as concentrações de cafeína observadas em águas superficiais brasileiras variaram de 0,29 à 753.500,0 ng L⁻¹, e em águas destinadas ao abastecimento público de 1,8 à 5800,0 ng L⁻¹. Tais resultados foram semelhantes aos observados nos locais amostrados no presente estudo (5,5 – 69.585,5 ng L⁻¹).

Em países com sistemas de coleta e tratamento de esgotos domésticos bem estabelecidos, as concentrações de cafeína são referentes à eficácia do tipo de tratamento utilizado. No entanto, mesmo em países com técnicas mais avançadas no tratamento e remoção de compostos de preocupação emergente, a cafeína ainda está presente em diferentes matrizes em concentrações relevantes.

No estudo realizado por SILVA *et al.* (2014) as concentrações de cafeína em águas superficiais, água potável (de fontes públicas) e águas residuais em Portugal variaram de 1,0 à 14.200,0 ng L⁻¹. MC EACHRAN *et al.* (2015) encontraram cafeína em águas subterrâneas na concentração de 12,0 ng L⁻¹.

Os hormônios estriol (E3), estrona (E1), 17β-estradiol (E2) e 17α-etinilestradiol (EE2) foram quantificados em todos os locais amostrados, exceto no reservatório Cascata. Os hormônios estrona, estriol e estradiol são estrogênios endógenos, e a frequência de quantificação foi de 19%, 24% e 17%, respectivamente; enquanto o hormônio sintético etinilestradiol apresentou frequência de 28%.

Os hormônios são substâncias ativas em baixas concentrações (ng L⁻¹), uma vez que, muitos dos hormônios são intrínsecos aos seres vivos; e quando sintéticos, são formulados para serem similares aos hormônios naturais (como por exemplo os hormônios contraceptivos, ou utilizados em reposições hormonais). Ainda que presentes em baixas concentrações em ambientes aquáticos, tais compostos podem afetar o sistema reprodutivo de espécies aquáticas.

Os humanos e os animais excretam uma quantidade considerável de hormônios, tais compostos podem atingir as águas superficiais e subterrâneas pelas estações de tratamento de efluentes domésticos, sistemas sépticos e escoamento agrícola (quando esgoto e esterco são usados como fertilizante). Os efluentes industriais de instalações de produção de hormônios sintéticos podem se tornar um contribuinte para a carga hormonal. Consequentemente, uma

carga não quantificada de estrogênio é liberada em ambientes aquáticos, onde pode ser absorvida por sedimentos e pela biota (MAZOTTO *et al.*, 2008).

O destino e comportamento dos compostos estrogênicos esteroidais no meio ambiente está diretamente relacionado às propriedades físicas e químicas, a hidrofobicidade, solubilidade, as quais são importantes para se compreender a rota e efeitos causados por esses compostos nos corpos hídricos (ADEEL *et al.*, 2017).

A ocorrência de hormônios estrogênicos naturais em baixas concentrações (ng L^{-1}) no meio ambiente tem sido investigada em todo o mundo e é uma questão emergente de contaminação. Em todo o mundo, quantifica-se na água hormônios esteróides, sendo que muitos deles são liberados de estações de tratamento de esgoto domésticos (BISWAS *et al.*, 2013; RAY *et al.*, 2013; ANDALURI *et al.*, 2012).

Os hormônios naturais, E3, E1 e E2 foram encontrados em águas brutas no Brasil em faixas que variaram entre 0,60 – 67,40 ng L^{-1} ; 0,30 – 78,10 ng L^{-1} e 0,60 – 6.806,00 ng L^{-1} , respectivamente (MANIERO *et al.*, 2008; OTOMO, 2010; MOREIRA *et al.*, 2011; JARDIM *et al.*, 2012).

Na revisão de MONTAGNER *et al.* (2017) sobre os contaminantes emergentes em matrizes aquáticas brasileiras; os hormônios foram encontrados em concentrações que variaram de 0,31 a 11.130,00 ng L^{-1} em águas superficiais; e de 1,00 a 340,00 ng L^{-1} em águas destinadas ao abastecimento público. Estima-se que a descarga anual mundial proveniente dos hormônios naturais E1, E2 e E3 somados, oriunda de sistema de tratamento de esgotos domésticos em corpos hídricos seja de 30.000 kg ano^{-1} (ADEEL *et al.*, 2017).

O 17 α -etinilestradiol é um hormônio sintético, que teve a formulação derivada do hormônio natural, o estradiol (E2). Diversos estudos relataram a capacidade do EE2 em alterar a determinação e maturidade sexual, e diminuir as características sexuais secundárias dos organismos expostos, mesmo que em baixa concentração (ng L^{-1}), imitando seu análogo natural, 17 β -estradiol (ARIS *et al.*, 2014).

No Brasil, o etinilestradiol foi quantificado em concentrações que variaram de 0,29 – 4.390,00 ng L^{-1} (BIANCHETTI, 2008; CLOUZOT *et al.*, 2008). ATKINSON *et al.* (2012) encontraram EE2 em água potável na Alemanha na concentração de 0,5 ng L^{-1} . Na Austrália, YING *et al.* (2009) encontraram 0,52 ng L^{-1} de EE2. E em um rio de Taiwan, CHEN *et al.* (2007) encontraram concentrações de EE2 que variaram de 7,53 – 27,40 ng L^{-1} .

De acordo com DE WIT *et al.* (2010), a presença de EE2 no meio ambiente tornou-se um problema, devido à sua alta resistência ao processo de degradação, tendência em absorver matéria orgânica, em acumular-se em sedimentos, e em concentrar-se na biota. O EE2 mostrou

maior potência estrogênica, quando comparado aos hormônios naturais E2 e E1 (SMITH *et al.*, 2010). Em ensaios *in vitro* foi observado que o EE2 é de 11 a 30 vezes mais potente que E2, enquanto que o E2 foi de 2 a 3 vezes mais potente que E1 (COLMAN *et al.*, 2009).

Na aquicultura e pecuária, o EE2 é usado para desenvolver populações de peixes de um único sexo a fim de otimizar o crescimento. A determinação do sexo em peixes está principalmente ligada ao controle genético, mas pode ser influenciada por várias condições ambientais e exposição a compostos estrogênicos disponíveis no ambiente (KÖRNER *et al.*, 2008; KUSTER *et al.*, 2005).

NOTCH *et al.* (2007), provaram que o EE2 é uma substância tóxica para organismos aquáticos adultos; uma vez que este hormônio pode exercer efeitos co-carcinogênicos, reduzindo a capacidade de um organismo de reparar adutos de DNA.

Diversos estudos relacionam a exposição de IEs em organismos não-alvo a adversos. Já foram relatadas alterações no crescimento (estágio inicial de desenvolvimento), sucesso reprodutivo (fertilidade e sucesso da eclosão) e também o impacto no nível da população após exposição a diferentes substâncias estrogênicas (YAN *et al.*, 2012).

Entre os IEs, os estrogênios são os principais contribuintes da atividade estrogênica, e a rota para o meio ambiente se deve principalmente por meio dos efluentes domésticos, hospitalares, de águas residuais e de atividades pecuárias (YING *et al.*, 2002).

A preservação dos recursos hídricos está diretamente relacionada ao monitoramento da contaminação por diferentes fontes. Além da presença de cafeína e dos hormônios, os praguicidas foram observados em grande parte das amostras analisadas. Foram 16 praguicidas analisados quanto à ocorrência em 7 rios e 3 reservatórios no Estado de São Paulo.

Os fungicidas, azoxistrobina e tebuconazole; o inseticida, malation; e o herbicida atrazina, foram encontrados em todos os locais amostrados no presente estudo, conforme mostrado na Tabela 6. Apesar de o fungicida carbendazim ter sido quantificado em 60% dos locais amostrados, a ocorrência desse composto foi em 85% do total de amostras analisadas. Seguido do inseticida malation (49%) e do herbicida 2,4-D (44%).

Na Tabela 7 são apresentadas as concentrações dos praguicidas encontrados no presente estudo em mais de 30% das amostras analisadas em comparação com concentrações obtidas em águas superficiais de outros estudos.

Tabela 7 – Concentrações dos praguicidas que foram detectados em mais de 30% no total de amostras analisadas no presente estudo, e concentrações encontradas em águas superficiais em outros trabalhos disponíveis na literatura

Substâncias	Faixa de concentração (ng L ⁻¹)	Referência
<i>Atrazina</i>	6,00 – 57,00	ACAYABA (2017)
	7,00 – 293,00	MONTAGNER <i>et al.</i> (2014)
	1,00 – 1650,00	BERTRAM <i>et al.</i> (2015)
	3,10 – 85,64	*
<i>Carbendazim</i>	3,00 – 697,39	MASIÁ <i>et al.</i> (2015)
	3,00 – 781,00	MONTAGNER <i>et al.</i> (2014)
	3,80 – 284,93	*
<i>Diuron</i>	3,00 – 159,53	MASIÁ <i>et al.</i> (2015)
	5,10 – 93,00	ACAYABA (2017)
	26,00 – 134,06	*
<i>Malation</i>	3,01 – 320,35	MASIÁ <i>et al.</i> (2015)
	10,00 – 540,00	LABBS <i>et al.</i> (2002); NOGUEIRA <i>et al.</i> (2012)
	3,10 – 54,50	*
	30,00 – 3400,00	MARCHESAN <i>et al.</i> (2010)
<i>2,4-D</i>	62,00 – 207,00	RODIL <i>et al.</i> (2012)
	1,35 – 260,72	*
	30,00 – 35,00	GERÓNIMO <i>et al.</i> (2014)
<i>Tebuconazole</i>	30,00 – 40,00	WIGHTWICK <i>et al.</i> (2012)
	0,50 – 13,51	*
	12,00 – 48,00	TAGERT <i>et al.</i> (2014)
<i>Tebutiuron</i>	5,8 – 123,00	ACAYABA (2017)
	9,85 – 229,00	*

*Concentrações obtidas no presente estudo

O uso de praguicidas desempenha um papel importante na qualidade da colheita e proteção de alimentos, proporcionando benefícios para o aumento da produção, bem como na redução de pragas; porém, podem induzir danos à maioria dos solos agrícolas e seus ecossistemas (HERRERO-HERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

Em 2010, o mercado de agrotóxicos no Brasil atingiu um valor de aproximadamente US\$ 7,3 bilhões e representou 19% do mercado global de agrotóxicos (ANVISA, 2013). Com o aumento da venda e aplicação de agrotóxicos e consequente crescimento da produção agrícola, é esperada uma maior biodisponibilidade desses compostos em matrizes aquáticas.

As águas superficiais localizadas em áreas de agricultura intensiva, ou que estão sujeitas ao aporte de resíduos via *run-off* estão mais vulneráveis a contaminação por praguicidas, o que emerge como uma preocupação para a qualidade do ambiente, proteção da biota, destinação ao consumo humano (PALMA *et al.*, 2014).

Dos praguicidas que foram quantificados em mais de 30% das amostras analisadas no presente estudo, o diuron, tebutiuron e a atrazina também foram encontrados no estudo realizado por ACAYABA (2017) nas concentrações na faixa de 5,1 a 93,0 ng L⁻¹; 5,8 a 123,0 ng L⁻¹ e 6,0

a 57,0 ng L⁻¹ em águas superficiais de regiões do estado de São Paulo onde a cultura de cana-de-açúcar é bastante representativa.

ALBUQUERQUE *et al.* (2016) publicaram uma revisão sobre a ocorrência de praguicidas em águas brasileiras, onde os fungicidas carbendazim e tebuconazole foram encontrados entre 3,0 – 781,0 ng L⁻¹ e 6,0 – 44,0 ng L⁻¹, respectivamente; enquanto que o inseticida malation em concentrações que variaram de 10,0 – 147,0 ng L⁻¹, e o herbicida 2,4-D 300,0 – 3.400,0 ng L⁻¹.

Diversos praguicidas foram quantificados nos reservatórios Cascata, Jaguari e Guarapiranga, sendo o reservatório Cascata o que apresentou maior diversidade de praguicidas (Figura 23). De acordo com PALMA *et al.* (2014), o interesse nas concentrações de praguicidas em reservatórios têm emergido devido a diversos fatores, dentre os quais:

- (i) Os ecossistemas destes corpos d'água serem especialmente ameaçados devido ao alto risco de atividades antrópicas em águas rasas de baixa capacidade de diluição;
- (ii) O aumento nos tipos e quantidades dos praguicidas detectados na água pela intensificação das práticas agrícolas;
- (iii) O elevado potencial tóxico destes compostos para o ecossistema aquático e para populações humanas.

Mostra-se necessária a avaliação da dinâmica e do risco ecológico dos principais praguicidas existentes nos corpos d'água, pois é importante fornecer às autoridades de gestão ambiental de cada Estado, informações sobre a identificação e priorização dos compostos-alvo mais relevantes para alocar os esforços de monitoramento e gestão (GUILLÉN *et al.*, 2012; LÓPEZ-DOVAL *et al.*, 2012).

Nas últimas décadas, o 4-nonilfenol (NPE), o 4-octilfenol (OPE), o bisfenol A (BPA) e o triclosan (TCS) atraíram muita atenção devido a seus potenciais efeitos de desregulação endócrina, ou toxicidade à vida selvagem, bem como às preocupações com a saúde humana. Devido a esse potencial de desregulação endócrina, tais substâncias são conhecidas como xenoestrógenos (ALEXANDER *et al.*, 1988; FISS *et al.*, 2007; YOKOTA *et al.*, 2001).

Dentre os xenoestrógenos analisados nas amostras de água superficial, o BPA e os surfactantes (Octilfenol e Nonilfenol) tiveram concentrações ambientalmente relevantes passíveis de causarem efeitos em organismos não-alvo, apesar de suas potências endócrinas serem mais baixas que a dos hormônios.

Os corpos hídricos são os principais corpos receptores do bisfenol A (BPA); a maioria dos dados sobre o impacto do BPA provém de estudos em vertebrados aquáticos, peixes em maioria e, também em anfíbios, répteis e aves. Porém, poucos são os estudos realizados *in situ*

ou com amostras ambientais; a maioria das pesquisas acerca do BPA são conduzidas com ensaios de exposição direta à substância.

Das informações obtidas após diversos estudos com o BPA, soube-se que:

- (i) As concentrações de BPA variam drasticamente;
- (ii) BPA faz parte de uma mistura complexa de estressores químicos, e
- (iii) Diferentes espécies de vertebrados têm diferentes sensibilidades em relação aos xenobióticos, sem dúvida os experimentos de laboratório fornecem melhores informações para a compreensão do modo de ação e efeitos após exposição ao BPA (CANESI & FABBRI, 2015).

Definir concentrações seguras de BPA, ou de outros contaminantes emergentes tem sido uma tarefa difícil, pois são encontrados em diferentes matrizes ambientais, com faixas de concentrações muito variáveis. O BPA foi encontrado em efluentes de indústrias de papel e celulose na concentração de 17 mg L⁻¹ (FLINT *et al.*, 2012), enquanto em águas superficiais foram encontradas concentrações na ordem de µg L⁻¹ (CRAIN *et al.*, 2007).

No presente estudo o BPA ocorreu em todos os locais amostrados, e em 50% do total de amostras analisadas, o que mostra que mesmo em baixas concentrações (ng L⁻¹) é uma substância recorrente em matrizes aquáticas. Alguns autores avaliaram a ocorrência de BPA em águas brasileiras, e os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados no presente estudo.

BAUTISTA-TOLEDO *et al.* (2005) encontraram concentrações de Bisfenol A de 1,2 a 1301,0 ng L⁻¹; e SOUZA (2011) encontrou concentrações de 8,0 a 750,0 ng L⁻¹. No reservatório Guarapiranga, OTOMO (2015) quantificou BPA nas concentrações que variaram de 287 a 1061 ng L⁻¹.

Diversos estudos relataram o BPA como substância teratogênica com efeitos em níveis de 1 a 10 mg L⁻¹ (IWAMURO *et al.* 2003; SONE *et al.* 2004) e como um interferente endócrino após exposição a concentrações mais baixas (µg L⁻¹), possivelmente refletindo as concentrações efetivas presentes no ambiente (FLINT *et al.*, 2012).

Em relação ao potencial estrogênico do BPA, o consenso geral é que a atividade estrogênica do BPA é mediada por sua ligação aos receptores estrogênicos (ERs) em peixes (GIBERT *et al.* 2005), bem como em rãs (SUZUKI *et al.*, 2002). Um estudo de avaliação de risco ambiental conduzido por WRIGHT-WALTERS *et al.* (2011) mostrou que a concentração prevista de não causar efeito (PNEC) na vida selvagem é de 60 ng L⁻¹. Na Figura 23 são apresentadas concentrações de BPA encontradas em diferentes matrizes ambientais, e os efeitos após exposição ao BPA

Figura 25 – Escala dos efeitos observados em vertebrados aquáticos após exposição ao BPA

Fonte: Adaptado de CANESI & FABBRI, 2015

Entre as diversas classes de surfactantes, os não-iônicos representam a maior parte do mercado mundial de surfactantes. O alquilfenol (AP) está entre os tensoativos não-iônicos mais comumente usados que incorporam os dois grupos de compostos: etoxilados de nonilfenol (NPE) e etoxilados de octilfenol (OPE). A porcentagem de 80% dos alquilfenóis são feitos de NPE enquanto os restantes 20% são feitos de octilfenol (OPE) (SOLE *et al.*, 2000).

O NPE e OPE possuem diversas aplicações industriais: têxtil, processamento de couro, tinta látex, plástico, papel e celulose, dentre outras. Devido ao uso extensivo, a principal fonte de NPE presente no meio ambiente é industrial. Os processos industriais contribuem com 55% do uso total, enquanto 30% e 15% são referentes aos produtos de limpeza industriais e domésticos, respectivamente (ARANJO *et al.*, 2017).

Sendo o nonilfenol e o octilfenol, amplamente utilizados em produtos domésticos e industriais, a sua presença tem sido reportada em diversos compartimentos ambientais. Muitos estudos relacionaram efeitos de desregulação endócrina, alteração no desenvolvimento, reprodução e sistema neurológico em diferentes organismos após exposição ao nonilfenol (SHARMA & CHADHA, 2018; YANG *et al.*, 2015; PRIAC *et al.*, 2014; JIE *et al.*, 2013; MAO *et al.*, 2012).

As concentrações de alquilfenóis encontradas nas águas superficiais são geralmente baixas ($\text{ng} - \mu\text{g L}^{-1}$), pois, no ambiente aquático, alquilfenóis tendem a se associar com sedimentos (JOHN *et al.*, 2000). SHARMA *et al.* (2009), publicaram uma revisão da ocorrência e faixa de concentrações dos APs no meio ambiente. As concentrações de NPE variaram de $0,7 \text{ ng L}^{-1}$ a $158,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e as de OPE de $0,8$ a $1444,0 \text{ ng L}^{-1}$.

No presente estudo, o octilfenol e o nonilfenol ocorreram em todos os locais amostrados, em 26% e 24% das amostras analisadas, respectivamente. A faixa de concentração variou de $67,96$ a $69,70 \text{ ng L}^{-1}$ para o OPE, e de $57,64$ a $59,17 \text{ ng L}^{-1}$ para o NPE. CHEN *et al.* (2014) encontraram concentrações de APs que variaram de $36,3$ a $3366,0 \text{ ng L}^{-1}$ para o NPE, e $2,8$ a $581,0 \text{ ng L}^{-1}$ para o OPE em rios da China.

Diversos estudos mostraram que tanto o NPE quanto o OPE são tóxicos para espécies marinhas, estuarinas e de água doce (COMBER *et al.*, 1993; MCLEESE *et al.*, 1981), além de causarem efeitos na reprodução de diversas espécies, e induzirem efeitos estrogênicos em peixes (JOBLING & SUMPTER, 1993; PURDOM *et al.*, 1994).

As concentrações de efeito observadas (CEO) em *Rainbow trout* após exposição ao NPE e ao OPE foram de 5 e $20 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Isto sugere que locais impactados, onde são encontradas concentrações nessa ordem de grandeza, estão sujeitos a afetar a saúde reprodutiva dos peixes e, portanto, os alquilfenóis podem ter um papel significativo na feminização dos peixes (JOBLING *et al.*, 1996).

TOUSOVA *et al.* (2017) avaliaram a estrogenicidade do NPE e OPE, em diferentes técnicas bioanalíticas; e os efeitos no desenvolvimento de embriões de *zebrafish* após exposição aos compostos. E apesar de apresentarem estrogenicidade baixa em comparação ao 17β -estradiol, essas substâncias são passíveis de causar efeitos adversos nas concentrações encontradas no meio ambiente para organismos aquáticos.

Além das substâncias citadas, diversas outras são encontradas no meio ambiente e tem intensa utilização doméstica ou industrial. Dentre estas, o Triclosan, que é um agente antimicrobiano e conservante amplamente usado na formulação de produtos de higiene e cuidados pessoais (como cremes dentais, detergentes, sabonetes, shampoos, cremes e loções para cuidados com a pele).

Nos produtos geralmente encontra-se na faixa de concentração $0,1$ a $0,3\%$ do peso do produto (MONTASERI *et al.*, 2016). De acordo com a Diretiva de Cosméticos da União Europeia e *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos a concentração de triclosan não deve exceder $0,3\%$ do peso total do produto.

O uso rotineiro do triclosan resultou na sua ocorrência em águas residuais, superficiais, e até mesmo potável (ZHAO *et al.*, 2013). Vários estudos recentes demonstraram a presença de triclosan em diversas matrizes ambientais em vários países, em concentrações de 5 a 310 ng L⁻¹ (FAIR *et al.*, 2009; PINTADO-HERRERA *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2010).

Neste estudo, o triclosan, ocorreu apenas no Rio Araras, com concentrações que variaram de 5,60 – 7,20 ng L⁻¹, semelhantes ao que foi reportado na literatura. Mesmo que em baixas concentrações (ng L⁻¹) o triclosan pode causar efeitos adversos em organismos aquáticos. Diversos estudos na literatura relataram efeitos em algas, cladóceros e peixes (GUO *et al.*, 2017).

A informação da ocorrência de substâncias com potencial de desregulação estrogênica, complementa o entendimento de efeitos adversos observados na reprodução, desenvolvimento e alterações a níveis sub-celulares.

No estudo realizado por KASE *et al.* (2018), os resultados da avaliação de risco de substâncias obtidas por análises químicas correlacionaram-se positivamente com atividades estrogênicas (EEQ) usando bioensaios *in vitro*. Isso demonstra a capacidade de bioensaios em prever o risco de misturas causado por estrogênios esteróides, atendendo o propósito do monitoramento ambiental quanto à presença de interferentes endócrinos.

Os bioensaios são considerados como ideais para a triagem da estrogenicidade em amostras ambientais, que quando combinados com análise química fornecem uma análise mais específica (WANG, 2016). A necessidade de uma estratégia analítica para o monitoramento de IEs emerge como uma prioridade, considerando as relações complexas desses compostos no meio ambiente (SCOGNAMIGLIO *et al.*, 2016).

O monitoramento de interferentes endócrinos deve incluir não apenas a identificação e quantificação de compostos químicos com potencial de alteração do sistema endócrino, mas também a avaliação dos efeitos sobre os seres vivos por meio da elucidação dos mecanismos dose-resposta induzidos por substâncias específicas, bem como pela mistura de IEs presentes em amostras ambientais.

Nesse contexto, a integração de ensaios biológicos na avaliação de efeitos e a análise química na quantificação das substâncias presentes nas amostras são fundamentais para melhor compreensão e tomada de decisão quanto a presença de poluentes emergentes em matrizes aquáticas.

6 CONCLUSÕES

∴ A atividade estrogênica medida nas águas superficiais do Estado de São Paulo durante 2015 e 2016 foi semelhante a atividade medida em outros locais do Brasil e do mundo. Indicando que a presença de substâncias com potencial de desregulação endócrina é um problema mundial.

∴ Os resultados obtidos pelas análises químicas usando LC-MS/MS mostraram influência antrópica em todos os locais amostrados; devido às altas concentrações de cafeína.

∴ Dentre todas as substâncias analisadas, as que tiveram maior ocorrência no total de 116 amostras analisadas foram: cafeína (95%), carbendazim (85%), BPA (50%) e malation (49%).

∴ Pode observar-se que a presença das substâncias analisadas, ainda que em baixas concentrações (ng L^{-1}) podem causar efeitos adversos a organismos não alvo, por formarem misturas complexas.

∴ No bioensaio utilizando embriões de *Danio rerio* foram observados efeitos no desenvolvimento (efeito crônico) e mortalidade (efeito agudo) após exposição aos extratos das amostras ambientais.

∴ Com a utilização de técnicas de biomarcadores como a peroxidação lipídica e danos em DNA, foi possível observar que alterações moleculares podem ocorrer quando em exposição à substâncias presentes nas amostras ambientais em baixas concentrações.

∴ Dentre todos os locais estudados, o Ribeirão Pires apresentou os valores mais altos na atividade estrogênica medida pelo BLYES e o maior número de efeitos crônicos e agudos observados com o emprego do FET.

∴ De acordo com valores de desencadeamento de efeitos disponíveis na literatura, o presente estudo propôs faixas para categorizar a atividade estrogênica com os resultados obtidos no FET. Sugerindo ensaios complementares e avaliação de efeitos de desregulação endócrina.

∴ A combinação das análises biológicas e químicas possibilitou uma investigação mais ampla e integrativa da atividade estrogênica e da ocorrência de interferentes endócrinos em matrizes aquáticas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACAYABA R. D., Ocorrência de agrotóxicos usados na cana-de-açúcar em corpos d'água do Estado de São Paulo, Dissertação de Mestrado – UNICAMP, 2017. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/322582>, acesso em 02 de Janeiro de 2018.
- ADEEL M., SONG X., WANG Y., FRANCIS D., YANG Y., Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review, *Environment International*, 99:107-119, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.12.010>.
- AGUIRRE-MARTÍNEZ G.V., DEL VALLS T.A., MARTÍN-DÍAZ M.L., Early responses measured in the brachyuran crab *Carcinus maenas* exposed to carbamazepine and novobiocin: Application of a 2-tier approach, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 97:47-58, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.07.002>.
- AHEL M., GIGER W., SCHAFFNER C., Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment—II. Occurrence and transformation in rivers, *Water Research*, 28(5):1143-1152, 1994. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)90201-1](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)90201-1).
- AIT ALLA A., MOUNEYRAC C., DUROU C., MOUKRIM A., PELLERIN J., Tolerance and biomarkers as useful tools for assessing environmental quality in the Oued Souss estuary (Bay of Agadir, Morocco). *Comp. Biochem. Physiol.* 143(1):23–29, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.11.015>.
- ALBUQUERQUE A. F., RIBEIRO J. S., KUMROW F., NOGUEIRA A. J. A., MONTAGNER C. C., UMBUZEIRO G. A., *Environ. Sci.: Processes Impacts*, 18:779-787, 2016. <https://doi.org/10.1039/C6EM00268D>
- ALEXANDER H.C., DILL D.C., SMITH L.W., GUINEY P.D., DORN P.B., Bisphenol A: acute aquatic toxicity, *Environ Toxicol Chem*, 7:19-26, 1988.
- ALMEIDA, E.A., BAINY A. C. D., LOUREIRO A. P. M., MARTINEZ G. R., MIYAMOTO S., ONUKIA J, FUJITA L. B., GARCIA C. C. M., PRADO F. M., RONSEIN G. E., SIGOLO C. A., BROCHINI C. B., MARTINS A. M. G., MEDEIROS M. H. G., DI MASCIO P., Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146A:588–600, 2007.
- ALTENBURGER R., AIT-AISSA S., ANTCZAK P., BACKHAUS T., BARCELÓ D., SEILER T.B., BRION F., BUSCH W., CHIPMAN K., DE ALDA M.L., UMBUZEIRO G.A., ESCHER B.I., FALCIANI F., FAUST M., FOCKS A., HILSCHEROVA K., HOLLENDER J., HOLLERT H., JÄGER F., JAHNKE A., KORTENKAMP A., KRAUSS M., LEMKINE G.F., MUNTHE J., NEUMANN S., SCHYMANSKI E.L., SCRIMSHAW M., SEGNER H., SLOBODNIK J., SMEDES F., KUGHATHAS S., TEODOROVIC I., TINDALL A.J., TOLLEFSEN K.E., WALZ K.H., WILLIAMS T.D., VAN DEN BRINK P.J., VAN GILS J., VRANA B., ZHANG X., BRACK W., Future water quality monitoring — Adapting tools to deal with mixtures of pollutants in water resource management, *Science of The Total Environment*, 512–513:540-551, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.057>.
- AMIARD-TRIQUET J., AMIARD C., RAINBOW P. S., *Ecological Biomarkers*, CRC Press/Taylor & Francis Group 600, Broken Sound Parkway NW, Suite 300/Boca Raton, FL 33487-2742. 2012

ANA – Agência Nacional de Águas, ANA, Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos / Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB, Agência Nacional de Águas – ANA, 2011.

ANDALURI G., SURI R.P., KUMAR K., Occurrence of estrogen hormones in biosolids, animal manure and mushroom compost, *Environ. Monit. Assess.*, 184:1197-1205, 2012.

ANDRADE-EIROA A., CANLE M., LEROY-CANCELLIERI V., CERDÀ V., Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review. part ii, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 80:655-667, ISSN 0165-9936, 2016 <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.014>.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária; UFPR – Universidade Federal do Paraná. Seminário de mercado de agrotóxico e regulação, 2013. Brasília: Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/monografias/index>. Acesso em: 11 Novembro de 2017.

APHA – American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation; Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed., American Public Health Association: Washington, 1998.

ARANJO F.G., BAUERGLDT G.F., CID Y.P., Nonylphenol: Properties, legislation, toxicity and determination. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 2017.

ARIS A. Z., SHAMSUDDIN A. S., PRAVEENA S. M., Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review, *Environment International*, 69: 104-119, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.04.011>.

ATKINSON S. K., MARLATT V. L., KIMPE L. E., LEAN D. R. S., TRUDEAU V. L., BLAISE J. M., The occurrence of steroidal estrogens in south-eastern Ontario wastewater treatment plants, *Sci Total Environ*, 430:119-125, 2012.

BABAY P. A., GETTAR R. T., SILVA M. F., THIELE B., BATISTONI D. A., Separation of nonylphenol ethoxylates and nonylphenol by non-aqueous capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 1116(1–2): 277-285, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.004>.

BAHLMANN A. , CARVALHO J.J., WELLER M.G., PANNE U., SCHNEIDER R.J., Immunoassays as high-throughput tools: monitoring spatial and temporal variations of carbamazepine, caffeine and cetirizine in surface and wastewaters, *Chemosphere*, 89:1278-1286, 2012.

BAIN P. A., KUMAR A., Cytotoxicity of binary mixtures of human pharmaceuticals in a fish cell line: Approaches for non-monotonic concentration–response relationships, *Chemosphere*, 108:334-342, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.077>

BARBOSA M.O., MOREIRA N.F.F., RIBEIRO A.R., PEREIRA M.F.R., SILVA A.M.T., Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015/495, *Water Research*, 94:257-279, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.047>.

BAREL-COHEN K., SHORE L. S., SHEMESH M., WENZEL A., MUELLER J., KRONFELD SCHOR N., Monitoring of natural and synthetic hormones in a polluted river, *Journal of Environmental Management*, 78(1):16-23, 2006. doi.org/10.1016/j.jenvman.2005.04.006.

BARRIOS-ESTRADA C., ROSTRO-ALANIS M.J., MUÑOZ-GUTIÉRREZ B.D., IQBAL H.M.N., SOUNDARAPANDIAN KANNAN, ROBERTO PARRA-SALDÍVAR, Emergent contaminants: Endocrine disruptors and their laccase-assisted degradation – A review, *Science*

of The Total Environment, 612:1516-1531, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.013>.

BAUMANN L., KNÖRR S., KEITER S., REHBERGER K., VOLZ S., SCHILLER V., FENSKE M., HOLBECH H., SEGNER H., BRAUNBECK T., Reversibility of endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*) after discontinued exposure to the estrogen 17 α -ethinylestradiol, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 278(3):230-237, ISSN 0041-008X, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.04.025>.

BAUTISTA-TOLEDO, I.; FERRO-GARCÍA, M. A.; RIVERA-UTRILLA, J.; MORENO-CASTILLA, C.; FERNÁNDEZ, V.F.J. Bisphenol a removal from water by activated carbon, Effects of carbon characteristics and solution chemistry. *Environmental Science Technology*, v. 39, n. 16, p. 6246-6250, 2005.

BEAUSOLEIL C., EMOND C., CRAVEDI J.P., ANTIGNAC J.P., APPLANAT M., APPENZELLER B.M.R., BEAUDOUIN R., BELZUNCES L.P., CANIVENC-LAVIER M.C., CHEVALIER N., CHEVRIER C., ELEFANT E., EUSTACHE F., HABERT R., KOLF-CLAUW M., LE MAGUERESSE-BATTISTONI B., MHAOUTY-KODJA S., MINIER C., MULTIGNER L., SCHROEDER H., THONNEAU P., VIGUIÉ C., POUZAUD F., ORMSBY J.N., ROUSSELLE C., VERINES-JOUIN L., PASQUIER E., MICHEL C., Regulatory identification of BPA as an endocrine disruptor: Context and methodology, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.02.001>.

BELFROID A.C., VAN DER HORST A., VETHAAK A.D., SCHÄFER A.J., RIJS G.B.J., WEGENER J., COFINO W.P., Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands, *Science of The Total Environment*, 225(1-2):101-108, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00336-2](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00336-2).

BERGMAN Å., HEINDEL J.J., JOBLING S., KIDD K.A., ZOELLER R.T. (Eds.), *State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals 2012*, United Nations Environment Programme and World Health Organization, Geneva (2013)

BERTRAM M. G., SAARISTO M., BAUMGARTNER J. B., JOHNSTONE C. P., ALLINSON M., ALLINSON G., WONG B. B. M., Sex in troubled waters: Widespread agricultural contaminant disrupts reproductive behaviour in fish, *Hormones and Behavior*, 70:85-91, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.03.002>.

BIANCHETTI, F.J. Remoção do agente hormonalmente ativo etinilestradiol por pré-oxidação e coagulação: estudo em escala de bancada. 90p. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

BILA D. M., DEZOTTI M., Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências, *Química Nova*, 30(3), 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000300027>

BIRCHENOUGH A.C., BARNES N., EVANS S. M., HINZ H., KRÖNKE I., MOSS C. A review and assessment of tributyltin contamination in the North Sea, based on surveys of butyltin tissue burdens and imposex/intersex in four species of neogastropods., *Marine Pollutant Bulletin*, 44(6):534-43. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00275-2](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00275-2)

BIRKETT J.W.; LESTER J.N. *Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes*. 1st ed. USA: IWA Publishing, Lewis Publishers CRC Press LLC, 2003.

BISWAS S., SHAPIRO C., KRANZ W., MADER T., SHELTON D., SNOW D., BARTELT-HUNT S., TARKALSON D., VAN DONK S., ZHANG T., Current knowledge on the environmental fate, potential impact, and management of growth-promoting steroids used in the US beef cattle industry, *J. Soil Water Con.*, 68:325-336, 2013.

BLOTTNER S., ROELANTS H., WAGENER A., WENZEL U.D., Testicular mitosis, meiosis and apoptosis in mink (*Mustela vison*) during breeding and non-breeding seasons, *Animal Reproduction Science*, 57(3-4):237-249, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(99\)00068-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(99)00068-8).

BOURGUIGNON J. P., SLAMA R., BERGMAN A., DEMENEIX B., IVELL R., KORTENKAMP R., PANZICA G, TRASANDE L., ZOELLER R. T., Science-based regulation of endocrine disrupting chemicals in Europe: which approach?, *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 4(8):643-646, ISSN 2213-8587, 2016 [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(16\)30121-8](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(16)30121-8).

BRACK W., AIT-AISSA S., BURGESS R.M., BUSCH W., CREUSOT N., DI PAOLO C., ESCHER B.I., HEWITT L.M., HILSCHEROVA K., HOLLENDER J., HOLLERT H., JONKER W., KOOL J., LAMOREE M., MUSCHKET M., NEUMANN S., ROSTKOWSKI, CHRISTOPH RUTTKIES, JENNIFER SCHOLLEE, EMMA L. SCHYMANSKI, TOBIAS SCHULZE, THOMAS-BENJAMIN SEILER P., TINDALL A.J., UMBUZEIRO G.A., VRANA B., KRAUSS M., Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic environments — An in-depth overview, *Science of The Total Environment*, 544:1073-1118, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.102>.

BRADFORD M. M., A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72:248-254, 1976.

BRAND W., DE JONGH C. M., VAN DER LINDEN S. C., MENNES W., PUIJKER L. M., VAN LEEUWEN C. J., VAN WEZEL A. P., SCHRIKS M., HERINGA M. B., Trigger values for investigation of hormonal activity in drinking water and its sources using CALUX bioassays, *Environment International*, 55:109-118, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.02.003>

BRANDER S.M., GLABER, M.K., FOWLER N.L., CONNON R.E., SCHLENK D., Pyrethroid Pesticides as Endocrine Disruptors: Molecular Mechanisms in Vertebrates with a Focus on Fishes, *Environmental Science and Technology*, 50, 8977–8992, 2016. <https://dx.doi.org/10.1021/acs.est.6b02253>.

BRASIL, Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental – SNSA. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – 2015. 212 p.: il. Brasília: SNSA/MCIDADES, 2017.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. Lei n. 9.433:Política Nacional de Recursos Hídricos. Brasília: Secretaria de Recursos Hídricos, 1997. 72p. 1997

BRASIL. CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente, Resolução Nº 357, de 17 de Março de 2005. Dispõe sobre a classificação de corpos d’água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento. Diário Oficial da União: República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, Nº53, 18 de Março de 2005, seção 1:58-63. 2005.

BRASIL. CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente, Resolução Nº 430, de 13 de Maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e

altera a Resolução Nº 357 de 17 de Março de 2005. Diário Oficial da União: República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, D, Nº92 de 16 de Maio de 2011, 2011.

BRAUNBECK T, BOETTCHER M, HOLLERT H, KOSMEHL T, LAMMER E, LEIST E, RUDOLF M, SEITZ N. Towards an alternative for the acute fish LC(50) test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species - an update. ALTEX. 2005;22(2) 87-102. PMID: 15953964. 2005.

BRAUNBECK, T., KAIS, B., LAMMER, E., Otte J., Schneider K., Stengel D., Strecker R. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future, Environ Sci Pollut Res, 22:16247, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3814-7>

BRITTIJN S., DUIVESTIJN S., BELMAMOUNE M., BERTENS L.F.M., BITTER W., DE BRUIJN J.D., CHAMPAGNE D.L., CUPPEN E., FLIK G., VANDENBROUCKE G.C.M., JANSSEN R.J., JONG I.M.L., DE LOET E.R., KROS A., MEIJER A.H., METZ J.R., VAN DER SAR A.M., SCHAAF M.J.M., SCHULTE-MERKER S., SPAINK H.P., TAK P.P. VERBEEK F.J., VERVOORDELDONK M.J., VONK F.J., WITTE F., YUAN H., RICHARDSON M.K., Zebrafish development and regeneration: new tools for biomedical research, Int. J. Dev. Biol., 53:835-850, 2009.

BUERGE I.J., POIGER T., MÜLLER M.D., BUSER H.-R., Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters, Environ Sci Technol, 37:691-700, 2003.

BURCHAM, P.C., Internal hazards: Baseline DNA damage by endogenous products of normal metabolism., Mutation Research, 443:11-36, 1999. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(99\)00008-3](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(99)00008-3)

CALDWELL D. J., MASTROCCO F., ANDERSON P. D., LANGE R., SUMPTER J. P., Predicted-no-effect concentrations for the steroid estrogens estrone, 17 beta-estradiol, estriol, and 17 alpha-ethinylestradiol, Environmental Toxicology Chemistry, 31(6):1396-1406, 2012.

CAMEL V., Solid phase extraction of trace elements, Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 58(I:7):1177-1233, ISSN 0584-8547, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0584-8547\(03\)00072-7](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(03)00072-7).

CAMPBELL C. G., BORGLIN S. E., GREEN F. B., GRAYSON A., WOZEI E., STRINGFELLOW W. T., Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review, Chemosphere, 65(8):1265-1280, ISSN 0045-6535, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.003>.

CAMPBELL N.R., DODDS E.C., LAWSON W., NOBLE R.L., Biological effects of the synthetic oestrogen hexaestrol: 4 : 4'-dihydroxy-γ : δ-diphenyl-n-hexane, The Lancet, 234(6049):312-313, 1939. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)61997-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)61997-9).

CANESI L., FABBRI E., Environmental Effects of BPA: Focus on Aquatic Species, An International Journal, 07-09:1-14, 2015. <https://doi.org/10.1177/1559325815598304>

CARGOUE M., PERDIZ D., MOUATASSIM-SOUALI A., TAMISIER-KAROLAK S., LEVI Y., Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). Science of the Total Environment, 324(1-3): 55-66, 2004.

CARNEIRO F. F, AUGUSTOM L. G. S., RIGOTTO, R. M., FRIEDICH K., BÚRIGO, A. C. 2015. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde, Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular. 2015.

CÉSPEDES C.L., TORRES P., MARÍN J.C., ARCINIEGAS A., DE VIVAR A.R., PÉREZ-CASTORENA A.L., ARANDA E., Insect growth inhibition by tocotrienols and hydroquinones from *Roldana barba-johannis*, *Phytochemistry*, 65(13):1963-1975, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.03.037>.

CHÂTEL A., FAUCET-MARQUIS V., GOURLAY-FRANCÉ C., PFOHL-LESZKOWICZ A., VINCENT-HUBERT F., Genotoxicity and activation of cellular defenses in transplanted zebra mussels *Dreissena polymorpha* along the Seine river, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114:241-249, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.023>.

CHEN C.Y., WEN T.Y., WANG G.S., CHENG H.W., LIN Y.H., LIEN G.W., Determining estrogenic steroids in Taipei waters and removal in drinking water treatment using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Sci Total Environ*, 378:352-365, 2007.

CHEN G., WHITE P. A., The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 567(2-3): 1383-5742, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2004.08.005>.

CHEN J., MENG T., LI Y., GAO K., QIN Z., Effects of triclosan on gonadal differentiation and development in the frog *Pelophylax nigromaculatus*, *Journal of Environmental Sciences*, 64: 157-165, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.05.040>.

CHEN J., MENG T., LI Y., GAO K., QIN Z., Effects of triclosan on gonadal differentiation and development in the frog *Pelophylax nigromaculatus*, *Journal of Environmental Sciences*, 64:157-165, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.05.040>.

CHEN R., YIN P., ZHAO L., YU Q., HONG A., DUAN S., Spatial-temporal distribution and potential ecological risk assessment of nonylphenol and octylphenol in riverine outlets of Pearl River Delta, China, *Journal of Environmental Sciences*, 26(11): 2340-2347, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.09.019>.

CHEUNG C.C.C., ZHENG G.J., LI A.M.Y., RICHARDSON B.J., LAM P.K.S., Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*, *Aquatic Toxicology*, 52(3-4):189-203, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00145-4](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00145-4).

CLOUZOT, L.; MARROT, B.; DOUMENQ, P.; ROCHE, N., 17 α -Ethinylestradiol : an endocrine disrupter of great concern. Analytical methods and removal processes applied to water purification. A review. *Environmental Progress*, v. 27, n. 3, p. 383-396, 2008.

COHN W. J., JAMES M. D., BOYLAN J., BLANKE R. V., PH.D., MARC W. FARISS, B.S., JOHN R. HOWELL, M.S., AND PHILIP S. GUZELIAN, M.D., Treatment of Chlordecone (Kepone) Toxicity with Cholestyramine — Results of a Controlled Clinical Trial, *The New England Journal of Medicine*, 298:243-248, 1978. <https://doi.org/10.1056/NEJM197802022980504>

COLBORN T., DUMANOSKI D., MYERS J. P., Our Stolen Future: Are We Threatening Our Fertility, Intelligence, and Survival? A Scientific Detective Story. NY:Dutton, p.306, 1996.

COLMAN J. R., BALDWIN D., JOHNSON L. L., SCHOLZ N. L., Effects of the synthetic estrogen, 17 α -ethinylestradiol, on aggression and courtship behavior in male zebrafish (*Danio rerio*), *Aquatic Toxicology*, 91(4): 346-354, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.12.001>.

COM – Committee on the Environment, Public Health and Consumer Policy of the European Parliament on the Commission Communication to the Council and European Parliament on the Community Strategy for endocrine Disrupters. Report: A5-0197/2000, Bruxelles, 1999.

COMBARNOUS Y., Endocrine Disruptor Compounds (EDCs) and agriculture: The case of pesticides, *Comptes Rendus Biologies*, 340(9–10):406–409, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2017.07.009>.

COMBER M.H.I., WILLIAMS T.D., STEWART K.M., The effects of nonylphenol on *Daphnia magna*, *Water Research*, 27 (2):273–276, 1993. [http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354\(93\)90086-W](http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354(93)90086-W)

CONLEY J. M., EVANS N., CARDON M.C., ROSENBLUM L., IWANOWICZ L. R., HARTIG P.C., SCHENCK K. M., BRADLEY P.M., WILSON V.S., Occurrence and In Vitro Bioactivity of Estrogen, Androgen, and Glucocorticoid Compounds in a Nationwide Screen of United States Stream Waters, *Environmental Science & Technology*, 51(9):4781–4791, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b06515>

CORSINI E., RUFFO F., RACCHI M., Steroid hormones, endocrine disrupting compounds and immunotoxicology, *Current Opinion in Toxicology*, 10:69–73, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.01.006>.

COSSU C., DOYOTTE A., BABUT M., EXINGER A., VASSEUR P., Antioxidant Biomarkers in Freshwater Bivalves, *Unio tumidus*, in Response to Different Contamination Profiles of Aquatic Sediments, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45(2):106–121, 2000. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1842>.

CRAIN D.A., ERIKSEN M., IGUCHI T., JOBLING S., LAUFER H., LEBLANC G.A., GUILLETTE L.J., An ecological assessment of bisphenol-A: Evidence from comparative biology, *Reproductive Toxicology*, 24(2):225–239, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.05.008>.

DAEE – Departamento de Águas e Energia Elétrica do Estado de São Paulo, disponível em: <http://www.aplicacoes.daee.sp.gov.br/usuarios/Daeeweb1.html>. Acesso em: 15/11/2017.

DAEE – Departamento de Águas e Energia Elétrica do Estado de São Paulo, disponível em: http://www.daee.sp.gov.br/acervoepesquisa/perh2204_2207/perh02.pdf Acesso em: 21/03/2017.

DAMIENS G., GNASSIA-BARELLI M., LOQUÈS F., ROMÉO M., SALBERT V., Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. *Chemosphere* 66(1):574–583, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.05.032>.

DE GUISE S., ROSS P.S., OSTERHAUS A.D.M.E., MARTINEAU D., BÉLAND P., FOURNIER M., Immune functions in beluga whales (*Delphinapterus leucas*): evaluation of natural killer cell activity, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 58(3–4): 345–354, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(97\)00035-4](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(97)00035-4).

DE WIT M., KEIL D., VAN DER VEN K., VANDAMME S., WITTER E., DE COEN W., An integrated transcriptomic and proteomic approach characterizing estrogenic and metabolic effects of 17 α -ethinylestradiol in zebrafish (*Danio rerio*), *Gen Comp Endocrinol*, 167:190–210, 2010.

DEPA – Danish Environmental Protection Agency, Danish Ministry of Environment. Evaluation of in vitro assays for determination of estrogenic activity in the environment. Working Report No. 43, 2003. Arbejdsrapport fra Miljøstyrelsen, 2003.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E., BOURGUIGNON, J.-P., GIUDICE, L. C., HAUSER, R., PRINS, G. S., SOTO, A. M., GORE, A. C. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews*, 30(4):293–342, 2009. <http://doi.org/10.1210/er.2009-0002>

DIAS A.C.V., GOMES F.W., BILA D.M., SANT'ANNA G.L., DEZOTTI M., Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 120:41-47, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.013>.

DÍAZ-CRUZ M.S., GARCÍA-GALÁN M.J., GUERRA P., JELIC A., POSTIGO C., ELJARRAT E., FARRÉ M., LÓPEZ DE ALDA M.J., PETROVIC M., BARCELÓ D., Analysis of selected emerging contaminants in sewage sludge, *TrAC Trends Anal. Chem. (Reference Ed.)*, 28:1263–1275, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.09.003>

DINIZ M.S., SALGADO R., PEREIRA V.J., CARVALHO G., OEHMEN A., REIS M.A.M., NORONHA J.P., Ecotoxicity of ketoprofen, diclofenac, atenolol and their photolysis byproducts in zebrafish (*Danio rerio*), *Science of The Total Environment*, 505:282-289, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.103>.

DIX, D.J., HOUCK, K.A., MARTIN, M.T., RICHARD, M.A., SETZER, R.W., KAVLOCK, R.J., The ToxCast program for prioritizing toxicity testing of environmental chemicals. *Toxicology Science*, 95 (1), 5-12, 2007.

DODDS E.C., LAWSON W. Synthetic oestrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature*;137, 1936. <https://doi.org/10.1038/137996a0>

DÖLL, P., DOUVILLE, H., GÜNTNER, A., MÜLLER SCHMIED H., WADA Y., Modelling Freshwater Resources at the Global Scale: Challenges and Prospects, *Surveys in Geophysics*, 37: 195. 2016. <https://doi.org/10.1007/s10712-015-9343-1>

DUSSAULT È.B., BALAKRISHNAN V.K., BORGMANN U., SOLOMON K.R., SIBLEY P.K., Bioaccumulation of the synthetic hormone 17 α -ethinylestradiol in the benthic invertebrates *Chironomus tentans* and *Hyaella azteca*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(6): 1635-1641, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.04.019>.

EA – ENVIRONMENT AGENCY. Proposed Predicted-No-Effect-Concentrations (PNECs) for Natural and Synthetic Steroid Oestrogens in Surface Waters. P2–T04/1. Bristol, UK: R&D Technical Report; 2004.

EC – European Commission, Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 of 20 March 2015 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council Off. J. Euro. Union, pp. 20–30 L78/40, 2015. https://doi.org/http://eur-lex.europa.eu/pri/en/oj/dat/2003/l_285/l_28520031101en00330037.pdf

EC – EUROPEAN COMMISSION. Commission presents scientific criteria to identify endocrine disruptors in the pesticides and biocides areas. Disponível em: http://europa.eu/rapid/press-release_IP-16-2152_en.html, acesso em 05 de Janeiro de 2018.

EC – EUROPEAN PARLIAMENT AND EUROPEAN COUNCIL, WFD, 2000. Disponível em: http://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/index_en.html, acesso em Novembro de 2017.

EFSA – European Food Safety Authority, Supports European Commission in Defining Scientific Criteria for Endocrine Disruptors, 2013.

EMBRY M.R., BELANGER S.E., BRAUNBECK T.A., GALAY-BURGOS M., HALDER M., HINTON D.E., LÉONARD M.A., LILICRAP A., NORBERG-KING T., WHALE G., The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research, *Aquatic Toxicology*, 97(2):79-87, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.008>.

ESCHER B. I., BAUMGARTNER R., KOLLER M., TREYER K., LIENERT J., MCARDELL C. S., Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater, *Water Research*, 45(1):75-92, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.019>.

ESCHER B.I., AÏT-AÏSSA S., BEHNISCH P.A., BRACK W., BRION F., BROUWER A., BUCHINGER S., CRAWFORD S.E., DU PASQUIER D., HAMERS T., HETTER K., HILSCHEROVÁ K., HOLLERT H., KASE R., KIENLE C., TINDALL A.J., TUERK J., VAN DER OOST R., VERMEIRSEN E., NEALE P.A., Effect-based trigger values for in vitro and in vivo bioassays performed on surface water extracts supporting the environmental quality standards (EQS) of the European Water Framework Directive, *Science of The Total Environment*, 628–629:748-765, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.340>.

ESCHER B.I., BAUMGARTNER R., KOLLER M., TREYER K., LIENERT J., MCARDELL C.S., Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater, *Water Research*, 45(1):75-92, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.019>.

EU – EUROPEAN UNION, Diretiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de Setembro de 2010, relativa à protecção dos animais utilizados para fins científicos. Disponível em: <https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/169b16db-cb47-46e3-aff5-caa8009ec295/language-pt/format-PDF/A1A>, acesso em: 02 de Janeiro de 2018.

FAIR P.A., LEE H., ADAMS J., DARLING C., PACEPAVICIUS G., ALAEE M., Occurrence of triclosan in plasma of wild Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and their environment, *Environ. Pollut.*, 157:2248-2254, 2009.

FENSKE M., VAN AERLE R., BRACK S., TYLER C. R., SEGNER H., Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton–Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 129(3):217-232, ISSN 1532-0456, 2001. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00194-6](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00194-6)

FERNANDEZ M. A.; LIMAVERDE A. M.; CASTRO I. B.; ALMEIDA A. C. M.; WAGENER A. L. R.; *Cadernos de Saúde Pública*, 18:463. 2002.

FISS E.M. , RULE K.L., VIKESLAND P.J., Formation of chloroform and other chlorinated byproducts by chlorination of triclosan-containing antibacterial products, *Environ Sci Technol*, 41:2387-2394, 2007.

GAGNÉ F., TROTTIER S., BLAISE C., SPROULL J., ERNST B., Genotoxicity of sediment extracts obtained in the vicinity creosote-treated wharf to rainbow trout hepatocytes. *Toxicology Letter*, 78:175-182. 1995.

GARMSHAUSEN J., KLOAS W., HOFFMANN F., 17 α -Ethinylestradiol can disrupt hemoglobin catabolism in amphibians, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 171:34-40, ISSN 1532-0456, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.03.004>.

GAVRILESCU M., DEMNEROVÁ K., AAMAND J., AGATHOS S., FAVA F., Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation, *New Biotechnology*, 32(1): 147-156, ISSN 1871-6784, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.01.001>.

GERÓNIMO E., APARICIO V. C., BÁRBARO S., PORTOCARRERO R., JAIME S., COSTA J. L., Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina, *Chemosphere*, 107:423-431, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.039>.

GIBERT Y., MCMILLAN D.R., KAYES-WANDOVER K., MEYER A., BEGEMANN G., WHITE P.C., Analysis of the very large G-protein coupled receptor gene (Vlgr1/Mass1/USH2C) in zebrafish, *Gene*, 353(2):200-206, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.05.015>.

GIGUÈRE, A.Y., COUILLARD Y., CAMPBELL P.G.C., PERCEVAL O., HARE L., PINEL-ALLOUL B., PELLERIN J., Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. *Aquat. Toxicol.* 64:185–200, 2003

GIUSTI A., LAGADIC L., BARSÍ A., THOMÉ J. P., JOAQUIM-JUSTO C., DUCROT V., Investigating apical adverse effects of four endocrine active substances in the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis*, *Science of The Total Environment*, 493:147-155, ISSN 0048-9697, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.130>

GOEPPERT N., DROR I., BERKOWITZ B., Detection, fate and transport of estrogen family hormones in soil, *Chemosphere*, 95:336-345, 2014. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.09.039.

GRÜN F., BLUMBERG B., Endocrine disrupters as obesogens, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 304(1–2): 19-29, ISSN 0303-7207, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.02.018>

GUILLÉN D., GINEBREDÁ A., FARRÉ M., DARBRA R.M., PETROVIC M., GROS M., BARCELÓ D., Prioritization of chemicals in the aquatic environment based on risk assessment: Analytical, modeling and regulatory perspective, *Science of The Total Environment*, 440: 236-252, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.064>.

GUILLETTE L. J. JR., PICKFORD D. B., CRAIN D. A., ROONEY A. A., PERCIVAL H. F., Reduction in Penis Size and Plasma Testosterone Concentrations in Juvenile Alligators Living in a Contaminated Environment, *General and Comparative Endocrinology*, 101(1):32-42, ISSN 0016-6480, 1996a. <https://doi.org/10.1006/gcen.1996.0005>.

GUILLETTE L. J. JR., VONIER P. M., MCLACHLAN J. A., Affinity of the alligator estrogen receptor for serum pesticide contaminants, *Toxicology*, 181–182:151-154, ISSN 0300-483X, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00272-X](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00272-X).

GUILLETTE L. J., ARNOLD S. F., MCLACHLAN J. A., Ecoestrogens and embryos – Is there a scientific basis for concern?, *Animal Reproduction Science*, 42(1–4):13-24, ISSN 0378-4320, 1996b. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01514-X](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01514-X).

GUO J., IWATA H., Risk assessment of triclosan in the global environment using a probabilistic approach, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 143: 111-119, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.05.020>.

HADDELAND I, HEINKE J, BIEMANS H, EISNER S, FLÖRKE M, HANASAKI N, KONZMANN M, LUDWIG F, MASAKI Y, SCHEWE J, STACKE T, TESSLER Z, WADA Y, WISSER D, Global water resources affected by human interventions and climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(9):3251–3256, 2014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302078110>

HARRIS D. C., *Quantitative Chemical Analysis*, Eighth Edition. W.H. Freeman and Company, New York, 2010

HASHIMOTO S., HORIUCHI A., YOSHIMOTO T., NAKAO M., OMURA H., KATO Y. Horizontal and vertical distribution of estrogenic activities in sediments and waters from Tokyo bay, Japan. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48(2): 209–216, 2005.

HASHMI M.A.K., ESCHER B.I., KRAUSS M., TEODOROVIC I., BRACK W., Effect-directed analysis (EDA) of Danube River water sample receiving untreated municipal wastewater from Novi Sad, Serbia, *Science of The Total Environment*, 624:1072-1081, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.187>.

HELBING C. C., CRUMP K., BAILEY C. M., KOHNO S., VELDHOFEN N., BRYAN T., BERMUDEZ D., GUILLETTE L. J., Isolation of the alligator (*Alligator mississippiensis*) thyroid hormone receptor α and β transcripts and their responsiveness to thyroid stimulating hormone, *General and Comparative Endocrinology*, 149(2): 141-150, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.05.019>.

HERBST AL, ULFELDER H, POSKANZER DC. Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women, *The New England Journal of Medicine*; 284:878-81 1971.

HERING D., BORJA A., CARSTENSEN J., CARVALHO L., ELLIOTT M., FELD C.K., HEISKANEN A.S., JOHNSON R.K., MOE J., PONT D., SOLHEIM A.L., VAN DE BUND W., The European Water Framework Directive at the age of 10: a critical review of the achievements with recommendations for the future, *Sci. Total Environ.*, 408:4007-4019, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.05.031>

HERRERO-HERNÁNDEZ E., RODRÍGUEZ-GONZALO E., ANDRADES M. S., SÁNCHEZ-GONZÁLEZ S., CARABIAS-MARTÍNEZ R., Occurrence of phenols and phenoxyacid herbicides in environmental waters using an imprinted polymer as a selective sorbent, *Science of The Total Environment*, 454–455: 299-306, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.03.029>.

HILSCHEROVA, K., MACHALA, M., KANNAN, K., BLANKENSHIP A.L., GIESY J. P., Cell bioassays for detection of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples, *Environmental Science & Pollution Research*, 7:159, 2000. <https://doi.org/10.1065/espr2000.02.017>

HUANG Y.Q., WONG C.K.C., ZHENG J.S., BOUWMAN H., BARRA R., WAHLSTRÖM B., NERETIN L., WONG M.H., Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts, *Environment International*, 42:91-99, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.04.010>.

ICCVAM – Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM). Expert panel evaluation on the validation status of the in vitro test methods for detecting endocrine disruptors: estrogen receptor and androgen receptor binding and transcription activation assays. Expert Panel Final Report. 2002.

INCTAA - Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas, Cafeína em águas de abastecimento público no Brasil. Maria Cristina Canela ... [et al.]. (editor). – São Carlos : Editora Cubo, 96 p.il. 2014.

IPCS – International Programme on Chemical Safety – IPCS, Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors, WHO/PCS/EDC/02.2, 2002.

IWAMURO S., SAKAKIBARA M., TERAOKA M., OZAWA A., KUROBE C., SHIGEURA T., KATO M., KIKUYAMA S., Teratogenic and anti-metamorphic effects of bisphenol A on embryonic and larval *Xenopus laevis*, *General and Comparative Endocrinology*, 133(2):189-198, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(03\)00188-6](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00188-6).

JARDIM W. F., MONTAGNER C. C., PESCARA I. C., UMBUZEIRO G. A., DEABERGAMASCO A. M., ELDRIDGE M., SODRÉ F. F., An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water, *Separation and Purification Technology*, 84:3-8, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.06.020>

JAROŠOVÁ B., BLÁHA L., GIESY J.P., HILSCHEROVÁ K., What level of estrogenic activity determined by in vitro assays in municipal waste waters can be considered as safe?, *Environment International*, 64: 98-109, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.12.009>

JAROŠOVÁ B., JAVŮREK J., ADAMOVSKÝ O., HILSCHEROVÁ K., Phytoestrogens and mycoestrogens in surface waters — Their sources, occurrence, and potential contribution to estrogenic activity, *Environment International*, 81:26-44, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.03.019>.

JARQUE S., BITTNER M., BLAHA L., HILSCHEROVA K, Yeast Biosensors for Detection of Environmental Pollutants: Current State and Limitations, *Trends in Biotechnology*, 34(5):408-419, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.01.007>.

JAYARAM K.C., *The Freshwater Fishes of the Indian Region*. Narendra Publishing House; Delhi: 1999.

JIE X., JIANMEI L., ZHENG F., LEI G., BIAO Z., JIE Y., Neurotoxic effects of nonylphenol: a review. *Wien Klin Wochenschr.*; 125:61-70, 2013.

JOBLING S., CASEY D., RODGERS-GRAY T., OEHLMANN J., SCHULTE-OEHLMANN U., PAWLOWSKI S., BRAUNBECK T., TURNER A.P., TYLER C.R., Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent, *Aquatic Toxicology*, 65(2):205-220, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(03\)00134-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00134-6).

JOBLING S., SHEAHAN D., OSBORNE J.A., MATTHIESSEN P., SUMPTER J.P., Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(2):194-202, 1996. <http://dx.doi.org/10.1897/1551-5028>

JOBLING S., SUMPTER J.P., Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes, *Aquatic Toxicology*, 27(3-4):361-372, ISSN 0166-445X, 1993. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(93\)90064-8](https://doi.org/10.1016/0166-445X(93)90064-8)

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

JOHN, D.M.; HOUSE, W.A.; WHITE, G.F., Environmental fate of nonylphenol ethoxylates: differential adsorption of homologs to components of river sediments, *Environ. Toxicol. Chem.*, 19:293–300, 2000.

JONKER W., LAMOREE M. H., HOUTMAN C. J., HAMERS T., SOMSEN G. W., KOOL J., Rapid activity-directed screening of estrogens by parallel coupling of liquid chromatography with a functional gene reporter assay and mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1406: 165-174, ISSN 0021-9673, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.06.012>.

Journal Environmental Quality, 31:1636-1648, 2002.

JURGENS R.W., DOWNEY L.J., ABERNETHY W.D., CUTLER N.R., CONRAD J., A comparison of circulating hormone levels in postmenopausal women receiving hormone replacement therapy, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 167(2):459-460, 1992. [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(11\)91429-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(11)91429-X).

KASE R., JAVURKOVA B., SIMON E., SWART K., BUCHINGER S., KÖNEMANN S., ESCHER B. I., CARERE M., DULIO V., AIT-AISSA S., HOLLERT H., VALSECCHI S., POLESSELLO S., BEHNISCH P., DI PAOLO C., OLBRICH D., SYCHROVA E., GUNDLACH M., SCHLICHTING R., LEBORGNE L., CLARA M., SCHEFFKNECHT C., MARNEFFE Y., CHALON C., TUSIL P., SOLDAN P., VON DANWITZ B., SCHWAIGER J., PALAO A. M., BERSANI F., PERCEVAL O., KIENTLE C., VERMEIRSEN E., HILSCHEROVA K., REIFFERSCHIED G., WERNER I., Screening and risk management solutions for steroidal estrogens in surface and wastewater, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 102: 343-358, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.02.013>.

KELLY KA, HAVRILLA CM, BRADY TC, ABRAMO KH, LEVIN ED. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environmental Health Perspectives*, 106:375–384. 1998.

KIDD K. A., BLANCHFIELD P. J., MILLS K. H., PALACE V. P., EVANS R. E., LAZORCHAK J. M., FLICK, R. W. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(21): 8897–8901, 2007. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609568104>

KIM S.D., CHO J., KIM I.S., VANDERFORD B.J., SNYDER S.A., Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters, *Water Research*, 41(5): 1013-1021, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.034>.

KIME D.E, NASH J.P, Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish, *Science of The Total Environment*, 233(1–3):123-129, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00219-3](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00219-3).

KIMMEL C.B., SCHILLING T.F., HATTA K., 4 Patterning of Body Segments of the Zebrafish Embryo, Editor(s): Hans R. Bode, *Current Topics in Developmental Biology*, Academic Press, 25:77-110, 1991. ISBN 9780121531256, [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)60412-3](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)60412-3).

KINNBERG K., TOFT G., Effects of estrogenic and antiandrogenic compounds on the testis structure of the adult guppy (*Poecilia reticulata*), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54(1): 16-24, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00010-6](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00010-6).

KIRBY M.F., NEALL P., BATEMAN T.A., THAIN J.E., Hepatic ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity in flounder (*Platichthys flesus*) from contaminant impacted

estuaries of the United Kingdom: continued monitoring 1999–2001, *Marine Pollution Bulletin*, 49(1–2):71-78, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.01.009>.

KOIFMAN S., KOIFMAN R. J., Environment and cancer in Brazil: an overview from a public health perspective, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 544(2–3):305-311, ISSN 1383-5742, 2003. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.07.005>.

KÖNIG M., ESCHER B. I., NEALE P.A., KRAUSS M., HILSCHEROVÁ K., NOVÁK J., TEODOROVIĆ I., SCHULZE T., SEIDENSTICKER S., HASHMI M.A.K., AHLHEIM J., BRACK W., Impact of untreated wastewater on a major European river evaluated with a combination of in vitro bioassays and chemical analysis, *Environmental Pollution*, 220(Part B):1220-1230, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.011>.

KÖRNER O., KOHNO S., SCHÖNENBERGER R., SUTER M. J. F., KNAUER K., GUILLETTE L. J., BURKHARDT-HOLM P., Water temperature and concomitant waterborne ethinylestradiol exposure affects the vitellogenin expression in juvenile brown trout (*Salmo trutta*), *Aquatic Toxicology*, 90(3): 188-196, 2008.

KÖRNER W., BOLZ U., SÜßMUTH W., HILLER G., SCHULLER W., HANF V., HAGENMAIER H., Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany, *Chemosphere*, 40(9–11):1131-1142, 2000. [doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00362-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00362-8).

KORTENKAMP A., Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals, *Environmental Health Perspective*, 15(1): 98–105, 2007. <https://doi.org/10.1289/ehp.9357>

KROON F., STRETEN C., HARRIES S., A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review, *PLoS One*, 12(4), 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0174762

KURISSERY S., KANAVILLIL N., VERENITCH S., MAZUMDER A., Caffeine as an anthropogenic marker of domestic waste: A study from Lake Simcoe watershed, *Ecological Indicators*, 23:501-508, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.05.001>.

KUSTER, M., LÓPEZ DE ALDA, M.J., BARCELÓ, D., Estrogens and progestogens in wastewater, sludge, sediments, and soil, *The Handbook of Environmental Chemistry*, 5:1-24, 2005.

LAABS V. , AMELUNG W. , PINTO A.A., WANTZEN M. , DA SILVA C.J., ZECH W., Pesticides in surface water, sediment, and rainfall of the northeastern Pantanal basin, Brazil

LAIR S., BÉLAND P., DE GUISE S., MARTINEAU D., Adrenal Hyperplastic and Degenerative Changes in Beluga Whales, *Journal of Wildlife Diseases* 33(3):430-437. 1997. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-33.3.430>

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*, 109:250-258, ISSN 0166-445X, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.09.004>.

LAWRENCE C., The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review, *Aquaculture*, 269(1–4):1-20, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.077>.

LAWS B.V., DICKENSON E.R.V., JOHNSON T.A., SNYDER S.A., DREWES J.E., Attenuation of contaminants of emerging concern during surface-spreading aquifer recharge, *Science of The Total Environment*, 409(6): 1087-1094, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.11.021>.

LEE R. F., STEINERT S., Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 544(1): 43-64, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(03\)00017-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00017-6).

LEGLER J., DENNEKAMP M., VETHAAK A. D., BROUWER A., KOEMAN J. H., VAN DER BURG B., MURK A. J., Detection of estrogenic activity in sediment-associated compounds using in vitro reporter gene assays, *Science of The Total Environment*, 293(1-3): 69-83, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)01146-9](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)01146-9).

LEONARD J.A., COPE W.G., BARNHART M.C., BRINGOLF R.B., Metabolomic, behavioral, and reproductive effects of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol on the unionid mussel *Lampsilis fasciola*, *Aquatic Toxicology*, 150:103-116, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.03.004>

LEUSCH F. D. L., DE JAGER, C., LEVI Y., LIM R., PUIJKER L., SACHER F., TREMBLAY L. A., WILSON V. S., CHAPMAN H. F., Comparison of Five in vitro Bioassays to Measure Estrogenic Activity in Environmental Waters, *Environmental Science Technology*, 44(10):3853-3860, 2010.

LEUSCH F. D. L., NEALE P. A., HEBERT A., SCHEURER M., SCHRIKS M. C. M., Analysis of the sensitivity of in vitro bioassays for androgenic, progestagenic, glucocorticoid, thyroid and estrogenic activity: Suitability for drinking and environmental waters, *Environment International*, 99: 120-130, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.12.014>.

LEUSCH F.D., CHAPMAN H.F., KORNER W., GOONERATNE S.R., TREMBLAY L.A., Efficacy of an advanced sewage treatment plant in southeast Queensland, Australia, to remove estrogenic chemicals, *Environmental Science Technology*, 39(15):5781-6, 2005.

LINTELMANN J., FISCHER K., MATUSCHEK G., Determination of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in particulate matter using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1133(1-2): 241-247, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.08.038>.

LIU Y. , TAM N.F.Y., GUAN Y., GAO B., Influence of a marine diatom on the embryonic toxicity of 17 α -Ethinylestradiol to the Abalone *Haliotis diversicolor supertexta*, *Water Air Soil Pollut*, 223:4383-4395, 2012.

LÓPEZ-DOVAL J. C., DE CASTRO-CATALÀ N., ANDRÉS-DOMÉNECH I., BLASCO J., GINEBRED A., MUÑOZ I., Analysis of monitoring programmes and their suitability for ecotoxicological risk assessment in four Spanish basins, *Science of The Total Environment*, 440: 194-203, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.07.035>.

MALETZ S., FLOEHR T., BEIER S., KLÜMPER C., BROUWER A., BEHNISCH P., HIGLEY E., GIESY J.P., HECKER M., GEBHARDT W., LINNEMANN V., PINNEKAMP J., HOLLERT H., In vitro characterization of the effectiveness of enhanced sewage treatment processes to eliminate endocrine activity of hospital effluents, *Water Research*, 47(4):1545-1557, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.12.008>.

- MANIERO, M.G.; BILA, D.M.; DEZOTTI, M., Degradation and estrogenic activity removal of 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol by ozonation and O₃/H₂O₂. *Science of the Total Environment*, v. 407, n. 1, p. 105-115, 2008.
- MAO Z., ZHENG X.F., ZHANG Y.Q., LI Y., WANG W., Occurrence and biodegradation of nonylphenol in the environment. *International Journal of Molecular Sci.*, 13:491-505, 2012.
- MARCHESAN E., ZANELLA R., AVILA L.A. DE, CAMARGO E..R., MACHADO S.L. DE O., MACEDO V.R.M., Rice herbicide monitoring in two Brazilian rivers during the rice growing season. *Scientia agricola*, 64(2): 131-137, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162007000200005>.
- MASIÁ A., VÁSQUEZ K., CAMPO J., PICÓ Y., Assessment of two extraction methods to determine pesticides in soils, sediments and sludges. Application to the Túria River Basin, *Journal of Chromatography A*, 1378: 19-31, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.11.079>.
- MAZOTTO V., GAGNÉ F., MARIN M.G., RICCIARDI F., BLAISE C., Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review, *Environ Int*, 34:531-545, 2008.
- MCEACHRAN, A. D., SHEA, D. , BODNAR, W. AND NICHOLS, E. G., Pharmaceutical occurrence in groundwater and surface waters in forests land-applied with municipal wastewater. *Environ Toxicol Chem*, 35:898-905, 2016. <https://doi.org/10.1002/etc.3216>
- MCLACHLAN J. A., NEWBOLD R. R., SHAH H. C., HOGAN M. D., DIXON R. L., Reduced fertility in female mice exposed transplacentally to diethylstilbestrol (DES), *Fertility and Sterility*, 38(3):364-371, 1982. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)46520-9](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)46520-9)
- MCLEESE D.W., ZITKO V., SERGEANT D.B., BURRIDGE L., METCALFE C.D., Lethality and accumulation of alkylphenols in aquatic fauna, *Chemosphere*, 10(7):723-730, 1981. [http://dx.doi.org/10.1016/0045-6535\(81\)90003-5](http://dx.doi.org/10.1016/0045-6535(81)90003-5)
- MEHRLE, P. M. J., BERGMAN, H. L., *Ecological Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. SETAC Special Publication Series. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, 5-85. 2012.
- MICIĆ V., HOFMANN T., Occurrence and behaviour of selected hydrophobic alkylphenolic compounds in the Danube River, *Environmental Pollution*, 157(10), 2759-2768, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.04.028>.
- MILLER D.H., ANKLEY G.T., Modeling impacts on populations: fathead minnow (*Pimephales promelas*) exposure to the endocrine disruptor 17 β -trenbolone as a case study, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59(1):1-9, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.05.005>
- MMA – Ministério do Meio Ambiente, disponível em: <http://www.mma.gov.br/agua> Acesso em 04/12/2017
- MONNERET C., What is an endocrine disruptor?, *C.R. Biologies*, 340:403-405, 2017.
- MONTAGNER C. C., VIDAL C., ACAYABA R. D., JARDIM W. F., JARDIM I. C., UMBUZEIRO G. A., Trace analysis of pesticides and an assessment of their occurrence in Brazilian surface and drinking waters. *Analytical Methods (Print)*, 6:6668-6677, 2014.
- MONTAGNER C. C.; VIDAL C., ACAYABA R. D., Contaminantes Emergentes Em Matrizes Aquáticas Do Brasil: Cenário Atual E Aspectos Analíticos, Ecotoxicológicos e Regulatórios.

Quím. Nova, São Paulo, 40(9):1094-1110, 2017. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170091>

MONTASERI H., FORBES P. B.C., A review of monitoring methods for triclosan and its occurrence in aquatic environments, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Part C, 85:221-231, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.09.010>.

MOREIRA, M.; AQUINO, S.; COUTRIM, M.; SILVA, J.; AFONSO, R., Determination of endocrine-disrupting compounds in waters from Rio das Velhas, Brazil, by liquid chromatography/high resolution mass spectrometry (ESI-LC-IT-TOF/MS). *Environmental Technology*, v. 32, n. 11-12, p. 1409-1417, 2011.

MORELLI J.J.; SZAJER G., Analysis of Surfactants: Part I. *Journal of Surfactants and Detergents*, 3(4), 2000.

MURRAY K.E., THOMAS S.M., BODOUR A.A., Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment, *Environ. Pollut.*, 158:3462–3471, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.08.009>

NEALE P. A., ALTENBURGER R., AÏT-AÏSSA S., BRION F., BUSCH W., UMBUZEIRO G. A., DENISON M. S., DU PASQUIER D., HILSCHEROVÁ K., HOLLERT H., MORALES D. A., NOVÁK J., SCHLICHTING R., SEILER T. B., SERRA H., SHAO Y., TINDALL A. J., TOLLEFSEN K. E., WILLIAMS T. D., ESCHER B. I., Development of a bioanalytical test battery for water quality monitoring: Fingerprinting identified micropollutants and their contribution to effects in surface water, *Water Research*, 123:734-750, 2017 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.016>.

NOGUEIRA E.N., DORES E.F.G.C., PINTO A.A., AMORIM R.S.S., RIBEIRO M.L., LOURENCETTI C., Currently used pesticides in water matrices in Central-Western Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(8), 1476-1487. 2012. <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532012005000008>

NOTCH E.G., MINIUTTI D.M., MAYER G.D., 17 α -Ethinylestradiol decreases expression of multiple hepatic nucleotide excision repair genes in zebrafish (*Danio rerio*), *Aquat Toxicol*, 84:301-309, 2007.

NRC – National Research Council, *Carcinogens and Anticarcinogens in the Human Diet: A Comparison of Naturally Occurring and Synthetic Substances*, Committee on Comparative Toxicity of Naturally Occurring Carcinogens, ISBN: 0-309-55659-7, 436 pages, 1996.

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development, Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD Publishing, Paris, 2013. <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>

OEHLMANN J., OETKEN M., SCHULTE-OEHLMANN U., A critical evaluation of the environmental risk assessment for plasticizers in the freshwater environment in Europe, with special emphasis on bisphenol A and endocrine disruption, *Environmental Research*, 108(2):140-149, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2008.07.016>.

OLIVEIRA, M., MARIA, V. L., AHMAD, I., SERAFIM, A., BEBIANNO, M. J., PACHECO, M., SANTOS, M. A., Contamination assessment of a coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal) using defence and damage biochemical indicators in gill of *Liza aurata* e an integrated biomarker approach. *Environmental Pollution*, 157:959-967. 2009.

OTOMO J.I., Contribuição antrópica na qualidade das águas da represa do Guarapiranga. Um estudo sobre interferentes endócrinos. 2015. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear -

Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. doi:10.11606/T.85.2015.tde-22072015-100401.

OTOMO J.I., Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de hormônios, considerados disruptores endócrinos, nas águas destinadas ao abastecimento público na região do Rio Paraíba do Sul, SP. 2010. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. doi:10.11606/D.85.2010.tde-11082011-161209

PALMA P., KÖCK-SCHULMEYER M., ALVARENGA P., LEDO L., BARBOSA I.R., DE ALDA M. L., BARCELÓ D., Risk assessment of pesticides detected in surface water of the Alqueva reservoir (Guadiana basin, southern of Portugal), *Science of The Total Environment*, 488–489: 208-219, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.04.088>.

PAN-EU – Pesticide Action Network Europe, PAN Europe impact assessment of the endocrine disrupting pesticides, 2015. Disponível em: <https://www.pan-europe.info/resources/reports?page=2>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2018.

PANTER G.H, THOMPSON R.S, SUMPTER J.P, Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone, *Aquatic Toxicology*, 42(4):243-253,1998. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(98\)00038-1](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(98)00038-1).

PAWLOWSKI S., VAN AERLE R., TYLER C. R., BRAUNBECK T., Effects of 17 α -ethinylestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57(3):330-345, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.07.019>.

PEELER E., THRUSH M., PAISLEY L., RODGERS C., An assessment of the risk of spreading the fish parasite *Gyrodactylus salaris* to uninfected territories in the European Union with the movement of live Atlantic salmon (*Salmo salar*) from coastal waters, *Aquaculture*, 258(1–4):187-197, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.042>.

PERENCEVICH E.N., WONG M.T., HARRIS A.D., National and regional assessment of the antibacterial soap market: A step toward determining the impact of prevalent antibacterial soaps, *American Journal of Infection Control*, 29(5): 281-283, 2001. <https://doi.org/10.1067/mic.2001.115469>.

PINTADO-HERRERA M.G., GONZALEZ-MAZO E., LARA-MARTIN P.A., Determining the distribution of triclosan and methyl triclosan in estuarine settings, *Chemosphere*, 95:478-485, 2014.

POPESKU J.T., MARTYNIUK C.J., MENNIGEN J., XIONG H., ZHANG D., XIA X., COSSINS A.R., TRUDEAU V.L., The goldfish (*Carassius auratus*) as a model for neuroendocrine signaling, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 293(1–2):43-56, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.06.017>.

PRIAC A., MORIN-CRINI N., DRUART C., GAVOILLE S., BRADU C., LAGARRIGUE C., TORRI G., WINTERTON P., CRINI G., Alkylphenol and alkylphenol polyethoxylates in water and wastewater: A review of options for their elimination. *Arabian Journal of Chemistry*, 2014. <https://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.05.01>.

PURDOM C., Genetic Conservation of Salmonid Fishes: edited by Joseph G. Cloud & Gary H. Thorgaard; Plenum Publishing Corporation, New York, in the NATO ASI Series: Series A: Life

Sciences, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 182(1):141-142, 1994. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(94\)90216-X](https://doi.org/10.1016/0022-0981(94)90216-X).

PURDOM C.E., HARDIMAN P.A., BYE V.J., ENO N.C., TYLER C.R., SUMPTER J.P., Estrogenic Effects of Effluents from Sewage Treatment Works, *Chemistry and Ecology*, 8(4): 275-285, 1994. <http://dx.doi.org/10.1080/02757549408038554>

RAIMUNDO C. C. M., Contaminantes emergentes em água tratada e seus mananciais: sazonalidade, remoção e atividade estrogênica. Tese de doutorado, Unicamp. 2011

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*; Rand, G. M., Chapter 1, ed.; 2nd ed., Taylor & Francis: Washington, 1995.

RAO K., LEI B., LI N., MA M., WANG Z., Determination of estrogens and estrogenic activities in water from three rivers in Tianjin, China, *Journal of Environmental Sciences*, 25(6): 1164-1171, 2013. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(12\)60149-1](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(12)60149-1).

RAY P., ZHAO Z., KNOWLTON K., 17 emerging contaminants in livestock manure: hormones, antibiotics and antibiotic resistance genes, E. Kebreab (Ed.), *Sustainable Animal Agriculture*, Cabi Internaional, Boston MA, U.S.A., pp. 268-283, 2013.

REIF D.M., MARTIN M.T., TAN S.W., HOUCK K.A., JUDSON R.S., RICHARD A.M., KNUDSEN T.B., DIX D.J., KAVLOCK R.J., Endocrine profiling and prioritization of environmental chemicals using ToxCast data, *Environmental Health Perspective*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20826373>118(12):1714-1720, 2010. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002180>

RIVERO-WENDT C. L. G., Avaliação toxicológica do hormônio 17-alfa-metiltestosterona em espécies aquáticas. Tese, Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular- Faculdade de Medicina/ Universidade de Brasília, 2013.

RODIL R., PRIETO A., QUINTANA J. B., RODRÍGUEZ I., CELA R., MÖDER M., Evaluation of low-cost disposable polymeric materials for sorptive extraction of organic pollutants in water samples, *Analytica Chimica Acta*, 716: 119-127, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.12.023>.

ROUTLEDGE E. J., PARKER J., ODUM J., ASHBY J., SUMPTER J.P., Some Alkyl Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) Are Estrogenic, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 153(1):12-19, 1998. <https://doi.org/10.1006/taap.1998.8544>.

RUBINSTEIN A.L., Zebrafish: from disease modeling to drug discovery. *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.*, 6(2):218–23, 2003.

SANSEVERINO J., GUPTA R. K., LAYTON A. C., PATTERSON S. S., RIPP S. A., SAIDAK. L., SIMPSON M. L., SCHULTS T. W., SAYLER G. S., Use of *Saccharomyces cerevisiae* BLYES expressing bacterial bioluminescence for rapid, sensitive detection of estrogenic compounds, *Applied and Environmental Microbiology*, 71. 2005.

SANTOS T. G., MARTINEZ C. B. R., Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species, *Chemosphere*, 89(9):1118-1125, ISSN 0045-6535, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.05.096>.

SCHEIDER J., OEHLMANN J., The chicken embryo as a model organism for detection of potential endocrine disruptors, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular &*

Integrative Physiology, 154(1): 1095-6433, Supplement, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.05.070>.

SCHILIRÒ T., PORFIDO A., SPINA F., VARESE G. C., GILLI G., Oestrogenic activity of a textile industrial wastewater treatment plant effluent evaluated by the E-screen test and MELN gene-reporter luciferase assay, *Science of The Total Environment*, 432: 389-395, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.008>.

SCHMIDT S., BUSCH W., ALTENBURGER R., KÜSTER E., Mixture toxicity of water contaminants-effect analysis using the zebrafish embryo assay (*Danio rerio*), *Chemosphere*, 152:503-512, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.006>.

SCHOLZ S., MAYER I., Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 293(1–2):57-70, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.06.008>.

SCHOLZ S., SELA E., BLAHA L., BRAUNBECK T., GALAY-BURGOS M., GARCÍA-FRANCO M., GUINEA J., KLÜVER N., SCHIRMER K., TANNEBERGER K., TOBOR-KAPŁON M., WITTERS H., BELANGER S., BENFENATI E., CRETON S., CRONIN M.T.D., EGGEN R.I.L., EMBRY M., EKMAN D., GOURMELON A., HALDER M., HARDY B., HARTUNG T., HUBESCH B., JUNGSMANN D., LAMPI M.A., LEE L., LÉONARD M., KÜSTER E., LILLICRAP A., LUCKENBACH T., MURK A.J., NAVAS J.M., PEIJNENBURG W., REPETTO G., SALINAS E., SCHÜÜRMAN G., SPIELMANN H., TOLLEFSEN K.E., WALTER-ROHDE S., WHALE G., WHEELER J.R., WINTER M.J., A European perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 67(3): 506-530, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2013.10.003>.

SCHUG T.T., JANESICK A., BLUMBERG B., HEINDEL J. J., Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127(3–5), 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.08.007>.

SCOGNAMIGLIO V., ANTONACCI A., PATROLECCO L., LAMBREVA M. D., LITESCU S. C., GHUGE S. A., REA G., Analytical tools monitoring endocrine disrupting chemicals, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 80: 555-567, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.04.014>.

SCOTT P.D., BARTKOW M., BLOCKWELL S.J., COLEMAN H.M., KHAN S.J., LIM R., MCDONALD J.A., NICE H., NUGEGODA D., PETTIGROVE V., TREMBLAY L.A., WARNE M.S.J., LEUSH F.D.L., An assessment of endocrine activity in Australian rivers using chemical and in vitro analyses, *Environmental Science Pollutant Research*, 21:12951-12967, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3235-7>

SELDERSLAGHS I. W. T., VAN ROMPAY A. R., DE COEN W., WITTERS H. E., Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo, *Reproductive Toxicology*, 28(3): 308-320, ISSN 0890-6238, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.05.004>

SHARMA M., CHADHA P., Toxicity of non-ionic surfactant 4-nonylphenol an endocrine disruptor: A review, *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 6(2):Part C, 2018.

SHARMA V. K., ANQUANDAH G. A. K., YNGARD R. A., KIM H., FEKETE J., BOUZEK K., RAY A. K., GOLOVKO D., Nonylphenol, octylphenol, and bisphenol-A in the aquatic environment: A review on occurrence, fate, and treatment, *Journal of Environmental Science*

and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering, 44:5, 423-442. <http://dx.doi.org/10.1080/10934520902719704>

SILVA C.P., LIMA D.L.D., SCHNEIDER R.J., OTERO M., ESTEVES V.I., Evaluation of the anthropogenic input of caffeine in surface waters of the north and center of Portugal by ELISA, Science of The Total Environment, 479-480: 227-232, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.120>

SILVA J. C., DA COSTA L. L., SILVA J. R., Embryo yield and plasma progesterone profiles in superovulated dairy cows and heifers, Animal Reproduction Science, 69(1-2):1-8, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00172-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00172-5).

SILVERSTEIN R. M., Principles of organic mass spectrometry: By Dudley H. Williams and Ian Howe. McGraw-Hill, New York, 1973. 245 pp., Microchemical Journal, 19(1):103, ISSN 0026-265X, 1974. [https://doi.org/10.1016/0026-265X\(74\)90108-8](https://doi.org/10.1016/0026-265X(74)90108-8)

SKINNER M.K., MANIKKAM M., GUERRERO-BOSAGNA C., Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors, Reproductive Toxicology, 31(3):337-343, 2011. doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.10.012.

SMITH A. G., Chapter 93 - Toxicology of DDT and Some Analogues, Editor(s): Robert Krieger, Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition), Academic Press, Pages 1975-2032, 2010. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00093-8>.

SOLE M, LOPEZ D.E., ALDA M.J., CASTILLO M, PORTE C, PEDERSEN KL, BARCELO D. Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the Catalanian area (NE Spain). Environmental Science and Technology, 34:5076-5083, 2000.

SOLÉ M., LOBERA G., LIMA D., REIS-HENRIQUES M. A., SANTOS M. M., Esterases activities and lipid peroxidation levels in muscle tissue of the shanny *Lipophrys pholis* along several sites from the Portuguese Coast, Marine Pollution Bulletin, 56(5):999-1007, ISSN 0025-326X, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.01.016>

SONE K., HINAGO M., KITAYAMA A., MOROKUMA J., UENO N., WATANABE H., IGUCHI T., Effects of 17 β -estradiol, nonylphenol, and bisphenol-A on developing *Xenopus laevis* embryos, General and Comparative Endocrinology, 138(3):228-236, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.06.011>.

SOUZA R.R., Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de disruptores endócrinos resultantes de atividades antrópicas nas águas da região do Rio Paraíba do Sul, SP. 2011. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. [doi:10.11606/D.85.2011.tde-25082011-144150](https://doi.org/10.11606/D.85.2011.tde-25082011-144150)

SPENCE R., SMITH C., Male territoriality mediates density and sex ratio effects on oviposition in the zebrafish, *Danio rerio*, Animal Behaviour, 69(6):1317-1323, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.10.010>.

STEGEMAN J. J., Cytochrome P4501A expression in fish: Localization and significance of induction in diverse cell types, including endothelium, Marine Environmental Research, 39(1-4):371-372, ISSN 0141-1136, 1995. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(95\)98429-G](https://doi.org/10.1016/0141-1136(95)98429-G)

STERBA G., Freshwater Fishes of the World. Vista Books; London: 1962.

STOKER T. E., KAVLOCK R. J., Chapter 18 - Pesticides as Endocrine-Disrupting Chemicals a Disclaimer: Editor(s): Robert Krieger, Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third

Edition), Academic Press, Pages 551-569, 2010. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00018-5>.

STRUGER J., L'ITALIEN S., SVERKO E., In-use Pesticide Concentrations in Surface Waters of the Laurentian Great Lakes, 1994–2000, *Journal of Great Lakes Research*, 30(3): 435-450, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0380-1330\(04\)70360-3](https://doi.org/10.1016/S0380-1330(04)70360-3).

SUMPTER J. P., Endocrine Disrupters in the Aquatic Environment: An Overview, *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 33:1, 9–16, 2005.

SUMPTER J.P., The challenge: do pharmaceuticals present a risk to the environment, and what needs to be done to answer the question? *Environmental Toxicology Chemistry*, 33(9):1915. 2014. <https://doi.org/10.1002/etc.2666>.

SUPATTO W., TRUONG T. V., DÉBARRE D., BEAUREPAIRE E., Advances in multiphoton microscopy for imaging embryos, *Current Opinion in Genetics & Development*, 21(5): 538-548, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2011.08.003>.

SUTTON P., ZLATNIK M. G., WOODRUFF T. J., GIUDICE L. C., Chapter 19 - Environmental Factors and Reproduction, In Yen and Jaffe's *Reproductive Endocrinology* (Eighth Edition), edited by Jerome F. Strauss and Robert L. Barbieri, Content Repository Only!, Philadelphia, 2019, Pages 459-472.e3, ISBN 9780323479127, disponível online: 22 de fevereiro de 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47912-7.00019-6>.

SUZUKI A., SUGIHARA A., UCHIDA K., SATO T., OHTA Y., KATSU Y., WATANABE H., IGUCHI T., Developmental effects of perinatal exposure to bisphenol-A and diethylstilbestrol on reproductive organs in female mice, *Reproductive Toxicology*, 16(2):107-116, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(02\)00005-9](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(02)00005-9).

SVINGEN T., CHRISTIANSEN S., TAXVIG C., VINGGAARD A.M., *Environmental Toxicology: Pesticides*, Reference Module in Biomedical Sciences, Elsevier, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64383-0>.

TAGERT M. L. M., MASSEY J. H., SHAW D. R., Water quality survey of Mississippi's Upper Pearl River, *Science of The Total Environment*, 481: 564-573, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.084>.

TAKAHASHI H., Juvenile hermaphroditism in the zebrafish, *Brachydanio rerio*, *Bull Fac Fish Hokkaido University*, 28:57–65 1977.

THEODORAKIS, C.W., *Ecotoxicology*, 10: 245, 2001. doi.org/10.1023/A:1016677629442

THORPE K.L., CUMMINGS R.I., HUTCHINSON T.H., SCHOLZE M., BRIGHTY G., SUMPTER J.P., TYLER C.R., Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish., *Environ Sci Technol*, 37:1142–1149, 2003.

TORRES J. P., MALM O., VIEIRA E. D. R., JAPENGA J., KOOPMANS G. F., Organic micropollutants on river sediments from Rio de Janeiro State, Southeast Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, 18(2):477-488, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2002000200012>

TOUSOVA Z., OSWALD P., SLOBODNIK J., BLAHA L., MUZ M., HU M., BRACK W., KRAUSS M., DI PAOLO C., TARCAI Z., SEILER T.B., HOLLERT H., KOPRIVICA S., AHEL M., SCHOLLÉE J. E., HOLLENDER J., SUTER M.J.F., HIDASI A.O., SCHIRMER K., SONAVANE M., AIT-AISSA S., CREUSOT N., BRION F., FROMENT J., ALMEIDA A.C., THOMAS K., TOLLEFSEN K.E., UFI S.T., OUYANG X., LEONARDS P., LAMOREE M., TORRENS V.O., KOLKMAN A., SCHRIKS M., SPIRHZANLOVA P., TINDALL A.,

SCHULZE T., European demonstration program on the effect-based and chemical identification and monitoring of organic pollutants in European surface waters, *Science of The Total Environment*, 601–602: 1849-1868, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.032>.

TRAVERSO-SOTO J.M., GONZÁLEZ-MAZO E., LARA-MARTÍN P.A., Analysis of Surfactants in Environmental Samples by Chromatographic Techniques. In book: *Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis* edited by L. Calderon, 2012.

TUMM-ZOLLINGER E., FAIR G. M., Biodegradation of steroid hormones. *Journal Water Pollutant Control Fed.*, 37:1506-1510, 1965.

USEPA – United States Environmental Protection Agency, Aquatic Life Criteria For Contaminants Of Emerging Concern Part I General Challenges And Recommendations, OW/ORD Emerging Contaminants Workgroup, ACHESON, C. M., M. MILLS, S. HUTCHINS, T. M. MARTIN, G. D. SAYLES, K. M. SCHENCK, AND D. M. YOUNG. Endocrine disrupting chemical risk management research in the us epa's office of research and development. American Institute of Chemical Engineers (AIChE) Annual Meeting, Philadelphia, PA, 2008.

USEPA – United States Environmental Protection Agency, Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis. Environmental Protection Agency, Report No. EPA/630/R96/01229, 1997.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. Endocrine Disruptor Screening Program Universe of Chemicals. Disponível em (www.epa.gov/endo/pubs/edsp_chemical_universe_list_11_12.pdf). Acesso em 12/02/2018.

VALAVANIDIS A., VLAHOIANNI T., DASSENAKIS M., SCOULLOS M., Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(2):178-189, ISSN 0147-6513, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>

VÄLITALO P., PERKOLA N., SEILER T.B., SILLANPÄÄ M., KUCKELKORN J., MIKOLA A., HOLLERT H., SCHULTZ E., Estrogenic activity in Finnish municipal wastewater effluents, *Water Research*, 88:740-749, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.10.056>.

VAN DER LINDEN S.C., HERINGA M.B., MAN H.Y., SONNEVELD E., PUIJKER L.M., BROUWER A., VAN DER BURG B., Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays, *Environmental Science Technology*, 42(15):5814-20, 2008.

VAN DER OOST R., BEYER J., VERMEULEN N. P. E., Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2):57-149, ISSN 1382-6689, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)

VAN DER OOST R., SILENO G, JANSE T, NGUYEN MT, BESSELINK H, BROUWER A, SIMONI (Smart Integrated Monitoring) as a novel bioanalytical strategy for water quality assessment: Part II-field feasibility survey, *Environ Toxicol Chem.*, 36(9):2400-2416.2017. <https://doi.org/10.1002/etc.3837>.

VAN GESTEL C.A., VAN BRUMMELEN T.C., Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*, 5(7):217-225. 1996. <https://doi.org/10.1007/BF00118992>

VANDERMARKEN A. T., CROESA K., VAN LANGENHOVEA K., BOONENA I., SERVAISB P., GARCIA-ARMISENB T., BRIONA N., DENISONC M.S., GOEYENSA L., ELSKENSA M., Endocrine activity in an urban river system and the biodegradation of estrogen-like endocrine disrupting chemicals through a bio-analytical approach using DRE- and ERE-CALUX bioassays, *Chemosphere*, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.036>

VASSEUR P., ATIENZAR F., COSSU-LEGUILLE C., RODIUS F., LEMIÈRE S., Ecological Biomarkers, Chapter 13 -Biomarkers of Genotoxicity for In Situ Studies at Individual and Population Levels, 327 – 351, 2012.

VEGA-BUSTILLOS O., SASSINE A., MARCH R., A espectrometria de massas quadrupolar. São Paulo, 2001.

VELDHOEN N., SKIRROW R.C., OSACHOFF H., WIGMORE H., CLAPSON D.J., GUNDERSON M.P., VAN AGGELEN G., HELBING C.C., The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development, *Aquatic Toxicology*, 80(3):217-227, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.08.010>.

VERENITCH S. S., LOWE C. J., MAZUMDER A., Determination of acidic drugs and caffeine in municipal wastewaters and receiving waters by gas chromatography–ion trap tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1116(1–2): 193-203, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.005>.

VERMEIRSEN E.L.M., BURKI R., JORIS C., PETER A., SEGNER H., SUTER M.J.F., Characterization of the estrogenicity of swiss midland rivers using a recombinant yeast bioassay and plasma vitellogenin concentrations in feral male brown trout. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(9): 2226–2233, 2005.

VIARENGO, A., LOWE, D., BOLOGNESI, C., FABBRI, E., KOEHLER, A., The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutantinduced stress syndrome in sentinel organisms, *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.*, 146:281-300. 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.04.011>.

VIGNARD J., MIREY G., SALLES B., Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: A direct and indirect lighting up, *Radiotherapy and Oncology*, 108(3):362-369, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.06.013>.

VILELA C. L. S., BASSIN J. P., PEIXOTO R. S., Water contamination by endocrine disruptors: Impacts, microbiological aspects and trends for environmental protection, *Environmental Pollution*, 235: 546-559, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.098>.

WALKER B. S., JANNEY J. C., Estrogenic substances. II. Analysis of plant sources, *Endocrinology*, 14:389-392. 1930. <https://doi.org/10.1210/endo-14-6-389>

WALKER C.H., The Use of Biomarkers to Measure the Interactive Effects of Chemicals, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 40(1–2):65-70, ISSN 0147-6513, 1998. <https://doi.org/10.1006/eesa.1998.1643>

WANG L., YING G., CHEN F., ZHANG L., ZHAO J., LAI H., CHEN Z., TAO R., Monitoring of selected estrogenic compounds and estrogenic activity in surface water and sediment of the Yellow River in China using combined chemical and biological tools, *Environmental Pollution*, 165:241-249, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.10.005>.

WANG, J., Computational Perspective for Developing Bioluminescent Yeast Estrogen Screens for Environmental Toxicology, PhD diss., University of Tennessee, 2016. http://trace.tennessee.edu/utk_graddiss/3670

WATER QUALITY ASSOCIATION – WQA, Contaminants of Emerging Concern, disponível em: <https://www.wqa.org/whats-in-your-water/emerging-contaminants>, acesso em: 30/01/2018.

WEST, Inc. & GULLEY D. D., BOELTER A.M., BERGMAN H.L., Western Ecosystems Technology TOXSTAT 3.5 Computer Program. 1996.

WHO – World Health Organization, Library Cataloguing in Publication Data Guidelines for drinking-water quality.—2nd ed., Chapter 2 - Water Quality Requirements, by Enderlein U. S., Enderlein R. E., Williams W. P., 1997.

WHO/UNEP, State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012. An assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme (UNEP) and World Health Organization (WHO), 2013. <http://www.who.int/ceh/publications/endocrine/en> <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.03.020>

WILLS E.D., Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. In: SNELL K., MULLOCK B., (eds.) Biochemical Toxicology: A practical approach. IRL Press, Washington, USA, 127-150, 1987.

WINSTON G. W., DI GIULIO R.T., Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms, Aquatic Toxicology, 19(2):137-161, ISSN 0166-445X, 1991. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(91\)90033-6](https://doi.org/10.1016/0166-445X(91)90033-6)

WIRGIN I., WALDMAN J. R., Altered gene expression and genetic damage in North American fish populations, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 399(2): 193-219, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00256-X](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00256-X).

WIGHTWICK A.M., REICHMAN S.M., Impacts of standard and ‘low environmental impact’ greywater irrigation on soil and plant nutrients and ecology, Applied Soil Ecology, 72:195-202, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.07.012>.

WIRGIN I., WALDMAN J.R., Altered gene expression and genetic damage in North American fish populations, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 399(2):193-219, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00256-X](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00256-X).

WORRALL F., BESIEN T., KOLPIN D.W., Groundwater vulnerability: interactions of chemical and site properties, Science of The Total Environment, 299(1–3):131-143, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00270-X](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00270-X).

WQA – Water Quality Association. Contaminants of Emerging Concern, disponível em: <https://www.wqa.org/whats-in-your-water/emerging-contaminants>, acesso em 19 de Dezembro de 2017.

WREN C.D., STEPHENSON G.L., The effect of acidification on the accumulation and toxicity of metals to freshwater invertebrates, Environmental Pollution, 71(2–4): 205-241, 1991. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(91\)90033-S](https://doi.org/10.1016/0269-7491(91)90033-S).

WRIGHT-WALTERS M., VOLZ C., TALBOTT E., DAVIS D., An updated weight of evidence approach to the aquatic hazard assessment of Bisphenol A and the derivation a new predicted no effect concentration (Pnec) using a non-parametric methodology, Science of The Total Environment, 409(4):676-685, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.07.092>.

- WU, C., HUANG, X., LIN, J., LIU J., Occurrence and fate of selected endocrine-disrupting chemicals in water and sediment from an urban lake, *Arch Environ Contam Toxicol*, 68:225-236. 2015. <https://doi.org/10.1007/s00244-014-0087-6>
- YAN Z., LU G., LIU J., JIN S., An integrated assessment of estrogenic contamination and feminization risk in fish in Taihu Lake, China, *Ecotoxicol Environ Saf*, 84:334-340, 2012.
- YANG O., KIM H.L., WEON J.I., SEO Y.R., Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis. *Journal of Cancer Prevention*, 20(1):12-24, 2015. doi:10.15430/JCP.2015.20.1.12.
- YING G., KOOKANA R. S., KUMAR A., MORTIMER M., Occurrence and implications of estrogens and xenoestrogens in sewage effluents and receiving waters from South East Queensland, *Science of The Total Environment*, 407(18): 5147-5155, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.06.002>.
- YING G.G., KOOKANA R.S., RU Y.J., Occurrence and fate of hormone steroids in the environment, *Environment International*, 28(6):545-551, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00075-2](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00075-2)
- YOKOTA H., SEKI M., MAEDA M., OSHIMA Y., TADOKORO H., HONJO T., Life-cycle toxicity of 4-nonylphenol to medaka (*Oryzias latipes*), *Environ Toxicol Chem*, 20:2552-2560, 2001.
- YOSHIDA Y, UMENO A, SHICHIRI M., Lipid peroxidation biomarkers for evaluating oxidative stress and assessing antioxidant capacity in vivo, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 52(1): 9-16, 2013. <https://doi.org/10.3164/jcbn.12-112>
- YOST, E.E., MEYER, M.T., DIETZE, J.E., MEISSNER, B.M., WORLEY-DAVIS, L., WILLIAMS, C.M., LEE, B., KULLMAN, S.W., Comprehensive assessment of hormones, phytoestrogens, and estrogenic activity in an anaerobic swine waste lagoon. *Environmental Science Technology*, 47(23):13781–13790, 2013.
- ZHAO J. L., ZHANG Q. Q., CHEN F., WANG L. , YING G. G., LIU Y. S., Evaluation of triclosan and triclocarban at river basin scale using monitoring and modeling tools: implications for controlling of urban domestic sewage discharge, *Water Res*, 47:395-405, 2013.
- ZHAO J.M., SUN L.W., ZHOU Y.Q., SPEAR P.A., MA M., WANG Z.J., Assessment of 17 α -ethinylestradiol effects and underlying mechanisms in a continuous, multigeneration exposure of the Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*). *Toxicology*, 2008.

8 ANEXO

8.1 Anexo I: Recuperação na SPE

Com o objetivo de comprovar a aplicabilidade do método de preparo de amostras e em atendimento às exigências da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 – Requisitos Gerais para a Competência dos Laboratórios de Ensaio e de Calibração (2005) foi realizada a validação do método de extração em fase sólida em amostras de água superficial para preparo das amostras para o bioensaio BLYES e análises químicas por LC-MS/MS. Como referência para a validação foi utilizado o documento orientador “*Biological Assay Validation <1033> (2010) – United States Pharmacopeial Convention (USP)*”. A metodologia e validação foi desenvolvida sob responsabilidade da MSc. Daniela Dayrell França no Setor de Análises Toxicológicas da CETESB.

Para validação do método, foram realizados testes com amostras de água ultrapura fortificadas com diferentes concentrações de 17 β -estradiol; foi realizada a extração das amostras fortificadas nas concentrações de 0,2, 1,3 e 13 ng L⁻¹, e foram realizados ensaios para a avaliação da atividade estrogênica utilizando o BLYES. Além dos resultados da recuperação da SPE no bioensaio BLYES, foram realizados cálculos estatísticos dos parâmetros da validação, todas as informações referentes à validação deste procedimento estão apresentados no documento do sistema de qualidade da CETESB intitulado: *Validação do método para determinação da atividade estrogênica com linhagem BLYES em amostras de água*. Na Tabela 8 estão apresentados os dados referentes à concentração real na amostra fortificada, a concentração medida no BLYES e a % de recuperação.

Tabela 8 – Recuperação em quatro diferentes concentrações do 17 β -estradiol

Concentração de E2 (ng L ⁻¹)	Concentração medida (ng L ⁻¹)	% Recuperação
0,2	0,165	60,5
1,3	1,264	92,9
13,0	13,175	96,8
54,4	53,3	98,1

8.2 Anexo II: BLYES

Descrição do preparo das soluções no *Bioluminescent Yeast Estrogen Screen* (BLYES) de acordo com o protocolo descrito por SANSEVERINO *et al.* (2005).

Para realização do ensaio utilizou-se a linhagem de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, capaz de responder a agentes estrogênicos presentes nas amostras ambientais. As linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foram modificadas pela inserção de um gene para expressão do receptor de estrogênio humano (hER), que se liga aos elementos de resposta ao estrogênio, inseridos em um promotor de um plasmídio que controla a expressão de genes de bactérias luminescentes, sendo assim a levedura é capaz de emitir luz quando entra em contato com alguma substância que se liga ao hER, ativando o promotor.

O meio de crescimento das leveduras (YMMG), composto pelo meio YMM e outras soluções foi preparado conforme descrição da Tabela 9.

Tabela 9 – Preparo do Meio Mínimo (YMM)

Reagentes	Concentração (g L ⁻¹)	Quantidade (g) ou (mL)
KH ₂ PO ₄	-	13,61g
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	1,98g
KOH (pellets)	-	4,2g
MgSO ₄	-	0,2g
FeSO ₄	0,8	1mL
L-histidina	10,0	50mL
Adenina	5,0	10mL
L-arginina	10,0	2mL
L-metionina	10,0	2mL
L-tirosina	10,0	3mL
L-isoleucina	10,0	3mL
L-fenilalanina	10,0	2mL
L-ácido glutâmico	50,0	2mL
L-valina	30,0	5mL
L-serina	37,5	10mL

O meio mínimo foi preparado pela adição dos itens listados na Tabela 9, com exceção dos aminoácidos em 1 litro de água ultrapura, autoclavado a 121°C por 10 minutos, após isso

adicionar as soluções de aminoácidos foram adicionadas. A solução de vitaminas foi preparada em 500 ml de água ultrapura e reagentes descritos na Tabela 10, após o preparo, foi realizada a esterilização da solução por filtração a 0,22µm. Após o preparo a solução foi armazenada em refrigerador.

Tabela 10– Formulação da solução de vitaminas

Composto	Concentração (g L ⁻¹)	Quantidade
Tiamina	-	20mg
Piridoxina	-	20mg
Ácido Pantotênico	-	20mg
Inositol	-	100mg
Biotina	0,02	50mL

O preparo do meio de cultura para crescimento das leveduras (YMMG), foi preparado conforme Tabela 11, e filtrado em membrana de 0,22µm de porosidade.

Tabela 11 – Meio de crescimento das leveduras (YMMG)

854,5mL do meio mínimo (YMM)
10,0mL da solução de vitamina
100,0mL da solução de glicose 20%
25,0mL da solução de ácido aspártico (4g L ⁻¹)
8,0mL da solução de treonina (24g L ⁻¹)
2,5mL de sulfato de cobre II (10g L ⁻¹)

De acordo com Sanseverino *et al.* (2005), para o preparo das culturas estoque das linhagens, as linhagens foram descongeladas e transferidas para um erlenmeyer contendo 30 ml do meio YMMG, a solução deve ficar sob agitação (250 rpm) por cerca de 20 horas a 30 °C, até que se atinja a DO₆₀₀ de cerca de 1 (densidade ótica). Distribuiu-se então, 1ml da cultura e 1 ml de uma solução de glicerol 40% em ampolas de congelamento, que ficaram armazenadas a -70°C.

Para preparar a cultura a ser utilizada no ensaio, uma ampola foi descongelada e adicionada em 25 ml do meio YMMG e agitada (250 rpm) por cerca de 20 horas a 30 °C, até a DO₆₀₀ de cerca de 1. O controle positivo do ensaio foi a solução padrão de 17β-estradiol (E2), com concentrações entre 2,5.10⁻¹³ – 1.10⁻⁶ mol L⁻¹, e os controles negativos do ensaio foram a solução de DMSO 4% e água ultrapura. O extrato orgânico foi ressuspensionado em

dimetilsulfóxido (DMSO), e completado com água ultrapura, com a concentração final de DMSO 10%. Foram testadas nove diluições para cada amostra, o percentual de DMSO final para as diluições, controles positivo e negativo será de 4% utilizando água como diluente. Exemplo da distribuição das amostras, controle positivo e negativo em uma placa de 96 poços (Figura 26).

Figura 26 – Distribuição das amostras, padrão de E2 e controles

Fonte: Adaptado de CETESB (2013)

8.3 Anexo III: Ensaio de sensibilidade e controle positivo do FET teste

A carta controle é utilizada para avaliar a sensibilidade dos organismos teste frente a uma substância de toxicidade conhecida. De acordo com as substâncias sugeridas em normas e protocolos de análises ecotoxicológicas, foi escolhido o $ZnCl_2$. Os resultados dos ensaios de sensibilidade dos embriões de *Danio rerio* utilizando como substância referência o $ZnCl_2$ estão apresentados na Figura 27.

Figura 27 - Carta controle com $ZnCl_2$ em embriões de *Danio rerio*

Conforme sugerido no protocolo OECD N. 236 (2013), foram realizados ensaios com a substância 3,5 Dicloro Anilina (DCA). Como critério de validação dos ensaios com embriões de zebrafish a mortalidade após exposição à DCA deve ser superior a 30% dos organismos expostos. Os resultados dos ensaios com DCA estão apresentados Tabela 12.

Tabela 12 – Resultados da mortalidade (%) dos organismos expostos à DCA

Data	Mortalidade (%)	Data	Mortalidade (%)
26/06/2016	70	09/02/2017	100
15/07/2016	80	09/03/2017	80
16/09/2016	60	16/03/2017	50
14/10/2016	90	23/03/2017	80
04/11/2017	40	25/05/2017	100
25/11/2016	50	29/06/2017	100
02/12/2016	90	06/07/2017	100
15/12/2016	70	27/07/2017	100
29/12/2016	90	03/08/2017	100
06/01/2017	60	04/08/2017	100

8.4 Anexo IV: Biomarcadores

Descrição da metodologia das técnicas de biomarcadores realizadas no presente estudo: peroxidação lipídica, danos em DNA e proteínas totais.

8.4.1 Peroxidação lipídica

Realizado de acordo com o método do ácido tiobarbitúrico descrito por WILLS (1987). A determinação foi realizada por meio de fluorescência utilizando 516 nm (excitação) e 600 nm (emissão). Os controles e padrões de tetrametoxipropano foram preparados em solução de homogeneização. Os resultados obtidos são expressos em $\mu\text{M TBARS mg}^{-1}$ de proteínas.

Solução A: Ácido (para diluir) em T °C ambiente; HCl 0,1 M; 3,64 mL de HCl em 996,36 mL de Mili-Q.

Solução B: Tetrametoxipropano 0,001%; 10 μL de TMP em 9,99 mL de HCl (solução A); 10 μL da solução B (Tetrametoxipropano 0,001%) em 990 μL de Mili-Q.

Obs: validade de 1 semana no escuro a 4 °C

Solução C: FeSO_4 – Peso Molecular: 278,02 g/mol; 0,279 g de FeSO_4 em 1 L de Mili-Q; (0,1391 g em 500 mL).

Solução D: TCA: 250 μg de Tricloroacético em 225 mL de “Solução C”; avolumar com Solução C para 250 mL.

Solução E: TBA (armazenar no escuro) 1,675 g de Tiobarbitúrico em 250 mL de Mili-Q; banho maria até obter 70 °C

Preparo: 150 μL da amostra + 300 μL TCA + 150 μL TBA

1º incubar no banho maria por 20 min

2º leitura por fluorescência

Excitação: 516 nm / Emissão: 600 nm

8.4.2 Danos em DNA

A metodologia de avaliação dos danos no DNA (*strand breaks*) foi realizada por meio do ensaio de precipitação alcalina com solução de K-SDS (GAGNÉ *et al.*, 1995). Foi utilizado espermatozoide de salmão como padrão de DNA para a calibração. A leitura do ensaio é por fluorescência em 360 nm (excitação) e 450 nm (emissão), os resultados obtidos foram expressos em μg DNA mg^{-1} de proteína total.

Etapas realizadas:

1º Solução SDS 2%: 10 mM EDTA + 10 mM Tris Base + 40 mM NaOH

Para 250 ml: SDS 2%: 2g em 100 ml (250 mL = 5g)

10 mM de EDTA (peso molecular: 292,24 g/mol)

250 ml = 0,01 mol/1000 ml x 292,2 g/1 mol = 0,703 g de EDTA

10 mM de Tris Base (peso molecular: 121,1)

250 ml = 0,01 mol/ 1000 mL x 121,1 g/1 mol = 0,30275 Tris Base

40 mM de NaOH

250 ml = 0,04/ 1000 x 40g/1 mol = 0,4 g de NaOH

2º KCl 0,12 M = para 250 ml

Peso molecular: 74,56 = 0,22368 g

3° Para Hoescht (250 ml)

Tampão Sodium cholate: 0,4 M NaCl + 4mM sodium cholate + 0,1M Tris-acetate (pH: 8,5)

Ajustar pH com ácido acético

Obs: solução pode ser armazenada em geladeira por dias

NaCl (58,44) 0,4M – para 200 ml

$58,44\text{g/mol} \times 0,4 \text{ mol/l} \times 0,2\text{L} = 4,6752\text{g}$

Sodium cholate (430,56) 4mM

$430,56 \times 0,04 \times 0,2 = 0,3444$

Trizma Acetate (181,2) 0,1M

$181,2 \times 0,1 \times 0,2 = 3,624 \text{ g}$

Hoescht (10 ml) - 10 mg ml^{-1}

33342 Trihydrochloride trihydrate

16,2 mM solution

Invitrogen H3570

TEIX : 10 mM Trizma base - HCl (peso molecular: 121,1), 1 mM EDTA (peso molecular: 380 g/mol), pH = 8, 100 ml: Trizma Base HCl = 0,1576 g, EDTA = 0,02922 g

Standard de Esperma de salmão:

Stock 1 mg/ml a 4 °C

100 µl de stock e diluir em 900 µl de TEIX

Etapas:

Inserir 200 µl de SDS 2%

25 µl tampão homogeneização

Misturar por inversão

Inserir 200 µl de KCl

Misturar por inversão

10 min a 60 °C em banho maria

Preparar Hoescht diário*

Misturar por inversão

Incubar durante 30 min a 4 °C

Centrifugar a 8000g por 5 min. a 4 °C.

*Hoescht diário:

Stock armazenado a 4 °C

1 mg de diabenzimide - 1 ml de metanol

Preparo: 10 µl de stock + 9,99 ml de sodium cholate

Placas negras: flat boot black

360 nm de excitação

450 nm de emissão

Agitar por 5 min.

Standard			+ 150 µL de Hoescht
Concentração (mg ml ⁻¹)	Esperma de Salmão (ml)	Volume tampão	
0	0	50	
0,455	0,5	49,5	
0,91	1	49	
2,27	2,5	47,5	
4,55	5	45	
9,09	10	40	
11,36	12,5	37,5	
13,63	15	35	

Stock: Standard de Salmão (armazenado em geladeira) 1 mg ml⁻¹, 0,01g de esperma de salmão, 1 ml de TEIX, Hoescht: 10 mg ml⁻¹ para 1 mg ml⁻¹, 100 µl de Hoescht em 900 µl de metanol (solução para diluir o tampão).

8.4.3 Quantificação de proteínas

Quantificação de proteínas pelo método de BRADFORD (1976). Etapas realizadas:

20 µl da amostra + 180 µl de Bradford

20 min. no escuro

Absorbância: 595 nm (software Gen5)

0,21 BSA + 85 µl H₂O_d + 15 µl stock

0,42 BSA + 70 µl H₂O_d + 30 µl stock

0,70 BSA + 50 µl H₂O_d + 50 µl stock

1,04 BSA + 25 µl H₂O_d + 75 µl stock

20 µl das soluções para curva + 1 ml de Bradford diluído em eppendorf por 20 minutos. no escuro, em temperatura ambiente.

Bradford diluído: 35 ml Mili-Q e 9 ml Bradford Stock

Quantificação por espectrofotometria, “Protein Assay Analysis”, Bradford Method.

8.5 Anexo V: Citotoxicidade e estrogenicidade nas amostras de água superficial

Este anexo apresenta os resultados das leituras do bioensaio *in vitro* BLYES para estrogenicidade a linhagem BLYR de citotoxicidade, mostrando a bioluminescência em contagem por segundo (CPS) no eixo y, e o fator de concentração no eixo x. A curva de bioluminescência e a curva de citotoxicidade medidas nas amostras de água superficial são apresentadas da Figura 28 até a Figura 49.

Figura 28 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES com 17 β -estradiol e Branco referente à 2015

Figura 29 - Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do reservatório Guarapiranga referente à 2015

Figura 30 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do Ribeirão Pires referente à 2015

Figura 31 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do rio Piracicaba referente à 2015

Figura 32 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do rio Jaguari referente à 2015

Figura 33 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do Ribeirão Grande referente à 2015

Figura 34 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do reservatório Jaguari referente à 2015

Figura 35 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do reservatório Cascata referente à 2015

Figura 36 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do rio Araras referente à 2015

Figura 37 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do rio Sapucaí-Guaçu referente à 2015

Figura 38 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do rio São Miguel Arcanjo referente à 2015

Figura 39 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES com 17 β -estradiol e Branco referente à 2016

Figura 40 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do reservatório Guarapiranga referente à 2016

Figura 41 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do Ribeirão Pires referente à 2016

Figura 42 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do rio Piracicaba referente à 2016

Figura 43 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do rio Jaguari referente à 2016

Figura 44 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do Ribeirão Grande referente à 2016

Figura 45 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do reservatório Jaguari referente à 2016

Figura 46 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do reservatório Cascata referente à 2016

Figura 47 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do rio Araras referente à 2016

Figura 48 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do rio Sapucaí-Guaçu referente à 2016

Figura 49 – Resultados de toxicidade pela linhagem BLYR e estrogenicidade pela linhagem BLYES nas amostras do rio São Miguel Arcanjo referente à 2016

8.6 Comitê de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"Investigação da atividade estrogênica e interferentes endócrinos em águas superficiais do estado de São Paulo"**, registrada com o nº **207/18** sob a responsabilidade de **José Roberto Rogero** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/IPEN) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP), em **15/02/2018**.

Finalidade:	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Fevereiro/2018 a Abril/2018
Espécie/linhagem/raça	Zebrafish, paulistinha (Danio rerio)
Nº de animais	12000
Peso/Idade	0,5 mg/indivíduo
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Laboratório de Ecotoxicologia do IPEN

São Paulo, 15 de fevereiro de 2018.

Patrick Jack Spencer
Coordenador da CEUA-IPEN

IPEN-CNEN/SP
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO IPEN
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária - CEP: 05508-000 - São Paulo - SP
Telefones: (011) 3133-9696 – Fax (011) 3133-9709
E-mail: ceuaipen@ipen.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Análise ecotoxicológica de águas residuárias através de uma experimento de exposição aguda utilizando embriões de Zebrafish (*Danio rerio*)", protocolo n° 1369/15, sob a responsabilidade de Mônica Valdyrce dos Anjos Lopes Ferreira – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 19/2/2015.

This is to certify that the proposal "Ecotoxicological analysis of wastewater through na aute exposure experiment using Zebrafish embryos (*Danio rerio*)", protocol n° 1369/15, under the responsibility of Mônica Valdyrce dos Anjos Lopes Ferreira – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) – has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 2/19/2015. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto:	N° de animais/espécie
04/2015 - 04/2018	
Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada	2.304 Embriões de Zebrafish <i>Danio rerio</i>

São Paulo, 23 de fevereiro de 2015

Dra. Wafá H. K. Cabrera
Coordenadora da CEUAIB

9 APÊNDICES

9.1 Dados brutos análises químicas

Tabela 13 - Substâncias quantificadas por LC-MS/MS em amostras referentes ao Reservatório Cascata

Reservatório Cascata	2015					2016					
	Fev	Abr	Jun	Out	Dez	Fev	Abr	Jun	Ago	Out	Dez
<i>Cafeína</i>	103,00	36,00	12,00	210,00	5,50	831,06	291,52	320,35		153,37	
<i>Carbendazim</i>	52,00	57,50	43,00	30,50	8,45	117,13	59,15			103,33	51,93
<i>Imidacloprida</i>	14,00	3,40	1,50								
<i>Carbofurano</i>				1,00							
<i>Hexizinona</i>		1,00	0,45	0,95							
<i>Tebutiuron</i>	16,33	19,40	9,85	18,50	3,65	4,06	4,43			5,77	
<i>Ametrina</i>	12	1,85	1,20	1,20		4,49	5,23		4,54		
<i>Atrazina</i>	16	9,40	3,10	3,75							
<i>Diuron</i>	55	36,50	26,00	47,50						48,57	37,09
<i>Clomazona</i>		30,50									
<i>Malation</i>	14	5,25	3,10	1,50	0,90						
<i>Tebuconazole</i>		0,55	0,50	0,65							
<i>Estrona</i>										71,81	
<i>Estradiol</i>								31,97	31,38	27,96	28,53
<i>Etinilestradiol</i>								54,90	51,50	60,39	58,19
<i>Bisfenol A</i>				377,50				70,06	41,92	71,67	75,53
<i>Octilfenol</i>								68,19	68,60	68,12	68,76
<i>Nonilfenol</i>								58,40	58,10	57,78	58,02

2,4-D	8,95	5,75	9,70	2,75	7,58	9,89	20,39	50,10	91,97	29,26
-------	------	------	------	------	------	------	-------	-------	-------	-------

Tabela 14 - Substâncias quantificadas por LC-MS/MS em amostras referentes ao Reservatório Guarapiranga

Reservatório Guarapiranga	2015					2016					
	Jan	Mar	Mai	Jul	Set	Jan	Mar	Mai	Jul	Set	Nov
<i>Cafeína</i>	438	475	44	44,5	25	240,34	12,77	10	1803,96	13324,41	12708,34
<i>Carbendazim</i>	24	46	24,5	26,5	10,5	22,17		32,06	16,36	42,04	43,71
<i>Tebutiuron</i>	16,334167										
<i>Atrazina</i>	16	16	6,25	3,95	2,25						
<i>Diuron</i>			4,7	6,65	15,55						
<i>Malation</i>	21	23	14	14	15,5						
<i>Tebuconazole</i>			0,4	0,4	0,5						
<i>Estradiol</i>										31,49	26,58
<i>Estriol</i>										97	
<i>Etinilestradiol</i>									63,28	53,79	64,67
<i>Bisfenol A</i>			3,3						186,13	266,17	79,27
<i>Octilfenol</i>									68,41	68,79	68,25
<i>Nonilfenol</i>									58,26	59,03	57,64
2,4-D					2,4				33,58	67,81	49,08
<i>Hidroxiatrazina</i>							27,92	72,26			

Tabela 17 - Substâncias quantificadas por LC-MS/MS em amostras referentes ao Ribeirão Pires

Ribeirão Pires	2015					2016					
	Jan	Mar	Mai	Jul	Set	Jan	Mar	Mai	Jul	Set	Nov
<i>Cafeína</i>	79,00	2526,00	2725,00	4229,00	2293,50	57183,60	5329,18	42071,19	64124,67	19230,60	51142,30
<i>Fipronil</i>			1,55	1,60	0,30						
<i>Carbendazim</i>	63,00	28,00	28,00	38,50	7,70	74,15		31,70	76,41	53,03	37,75
<i>Carbofurano</i>			1,25	2,60							
<i>Tebutiuron</i>	16,33										
<i>Atrazina</i>	16,00	15,00									
<i>Malation</i>	36,00	14,00	17,50	17,00	54,50						
<i>Tebuconazole</i>					0,40						
<i>Estrona</i>								49,69			
<i>Estradiol</i>								30,57			
<i>Estriol</i>				11,00				151,98	224,38		
<i>Etinilestradiol</i>								51,75	60,39	62,51	
<i>Bisfenol A</i>					8,65			48,99	53,26	203,66	
<i>Octilfenol</i>								69,07		68,34	
<i>Nonilfenol</i>								58,48		57,97	
<i>2,4-D</i>						29,03		34,64	30,88	31,86	

Tabela 18 - Substâncias quantificadas por LC-MS/MS em amostras referentes ao Rio Araras

Rio Araras	2015						2016				
	Fev	Abr	Jun	Ago	Out	Dez	Fev	Jun	Ago	Out	Dez
<i>Cafeína</i>	4520,00	606,00	1170,00	317,00	1074,50	2812,00	1187,37	56979,46	13490,72	8927,13	564,92
<i>Fipronil</i>		2,10	2,45	3,15	3,95	1,25					
<i>Carbendazim</i>	55,00	60,00	27,00	40,50	29,50	7,80	15,53	78,93	19,61	20,95	139,83
<i>Imidacloprida</i>	15,00	46,00	8,90								
<i>Simazina</i>		0,30									
<i>Carbofurano</i>		7,35									
<i>Hexazinona</i>	24,00	5,12	3,60	2,30	9,65	41,00				15,07	22,59
<i>Tebutiuron</i>	41,00	18,50	12,50	21,00	126,50	229,00		97,37	53,88	49,84	61,35
<i>Ametrina</i>		0,40	0,60	0,60							42,87
<i>Atrazina</i>	27,00	38,00	18,00		13,50	28,50					
<i>Diuron</i>		17,50	14,00	27,50	40,00	92,00					134,06
<i>Clomazona</i>						8,75					
<i>Azoxistrobina</i>					2,75	3,10					
<i>Malation</i>	16,00	11,50	8,65	7,25	14,25	32,50					
<i>Tebuconazole</i>		1,50	1,40	6,85	7,05	10,95					
<i>Estrona</i>				0,07					42,57	59,30	
<i>Estradiol</i>								27,80	27,89	30,43	32,34
<i>Estriol</i>				13,00	18,00			103,24	96,05	116,55	
<i>Etinilestradiol</i>								52,21	57,10	65,55	56,32
<i>Triclosan</i>				6,25	5,60	7,20					
<i>Bisfenol A</i>			11,50		2,10	2,80		181,24	54,37		421,16
<i>Octilfenol</i>								68,29	68,89	68,62	68,41
<i>Nonilfenol</i>								57,98	57,83		58,75

2,4-D	10,00	4,80	3,65	4,85	12,50	10,30	248,75	55,53	43,85	260,72
Hidroxiatrazina								23,34	19,91	100,53

Tabela 19 - Substâncias quantificadas por LC-MS/MS em amostras referentes ao Rio Jaguari

Rio Jaguari	2015					2016				
	Jan	Mar	Mai	Jul	Set	Jan	Mar	Mai	Jul	Set
<i>Cafeína</i>	450,00	396,00	359,00	408,50	366,00	3820,14	473,69	5408,70	9321,30	4742,48
<i>Fipronil</i>			0,50	0,40						
<i>Carbendazim</i>	68,00	29,00	13,10	16,60	8,00	43,85	18,63		68,02	29,10
<i>Imidacloprida</i>	14,00		12,50	12,15	12,00	28,05				
<i>Simazina</i>			0,25			43,53				
<i>Carbofurano</i>						107,38				
<i>Hexazinona</i>			0,20	0,25	0,20	36,72				
<i>Tebutiuron</i>	16,33	16,33				3,78		4,62		
<i>Ametrina</i>						4,83				
<i>Atrazina</i>	24,00	19,00	6,55	3,15		85,64				
<i>Diuron</i>			7,40	12,50	4,50					
<i>Malation</i>	18,00	14,00	7,75	11,50	3,30					
<i>Tebuconazole</i>			0,40	0,80	0,40					
<i>Estrona</i>								51,73	73,82	77,42
<i>Estradiol</i>									34,35	35,64
<i>Estriol</i>										90,06
<i>Etinilestradiol</i>								54,07	66,29	54,35
<i>Bisfenol A</i>			10,05	318,50	1,00	1300,44	246,77	383,67	143,67	92,52
<i>Octilfenol</i>									69,17	67,96
<i>Nonilfenol</i>									57,80	58,73
2,4-D								97,31	59,17	26,73

Hidroxiatrazina

26,44 232,84 16,89

Tabela 20 - Substâncias quantificadas por LC-MS/MS em amostras referentes ao Rio Piracicaba

Rio Piracicaba	2015					2016					
	Jan	Mar	Mai	Jul	Set	Jan	Mar	Mai	Jul	Set	Nov
<i>Cafeína</i>	30,00	133,00	1429,50	1322,50		4064,10	801,22	27162,96	18410,00	18410,00	2463,99
<i>Fipronil</i>			0,20	1,50	1,90						
<i>Carbendazim</i>	38,00	23,00	30,00	31,50			13,65	284,93	40,84	40,84	24,36
<i>Imidacloprida</i>		15,00	21,00	17,00							
<i>Simazina</i>			0,55	0,75							
<i>Hexizina</i>	15,00		2,50	1,30							
<i>Tebutiuron</i>	39,00		3,65	8,90			29,79	11,29	13,64	13,64	86,44
<i>Ametrina</i>	13,00			0,55		3,83	8,24	3,94			18,55
<i>Atrazina</i>	43,00	17,00	21,50	24,50							
<i>Diuron</i>			12,50	19,50							
<i>Malation</i>	28,00		11,50	20,00							
<i>Tebuconazole</i>			1,10	3,55					13,51	13,51	
<i>Estrona</i>									58,47	58,47	
<i>Estradiol</i>									36,53	36,53	
<i>Estriol</i>				9,45					90,82	90,82	
<i>Etinilestradiol</i>									59,23	59,23	
<i>Bisfenol A</i>			23,00	18,00					124,41	124,41	
<i>Octilfenol</i>									68,87	68,87	
<i>Nonilfenol</i>									58,22	58,22	
<i>2,4-D</i>			6,05	18,00	10,00	8,33			33,75	33,75	
<i>Hidroxiatrazina</i>							276,53	29,08	16,98	16,98	64,10

Tabela 21 - Substâncias quantificadas por LC-MS/MS em amostras referentes ao Rio São Miguel Arcanjo

Rio São Miguel Arcanjo	2015					2016					
	Fev	Abr	Jun	Out	Dez	Fev	Abr	Jun	Ago	Out	Dez
<i>Cafeína</i>	1463,00	87,50	292,00	38,00	107,50		152,62	30,13	1865,41	36028,22	43356,30
<i>Fipronil</i>				0,40							
<i>Carbendazim</i>	41,00	19,50	18,00	22,00	5,95		25,16	12,70	42,47	21,75	25,35
<i>Imidacloprida</i>	17,00	6,00	10,00	10,00	11,50						
<i>Hexizinona</i>			0,30	0,30							
<i>Tebutiuron</i>	16,33			2,35		16,29					13,62
<i>Ametrina</i>		0,35	0,45	0,55	0,40						
<i>Atrazina</i>	20	25,50	6,60	11,00	8,60						
<i>Diuron</i>				11,00							
<i>Malation</i>		1,25	2,45	1,90	1,75						
<i>Tebuconazole</i>		1,30	2,35	0,90	0,40						
<i>Estrona</i>										52,27	43,07
<i>Estradiol</i>										29,58	34,64
<i>Estriol</i>											149,40
<i>Etinilestradiol</i>										57,86	60,62
<i>Bisfenol A</i>			22,50	1,10	2,70					37,81	144,78
<i>Octilfenol</i>										69,07	69,70
<i>Nonilfenol</i>										58,09	58,33
<i>2,4-D</i>			6,05	1,35						40,50	37,09
<i>Hidroxiatrazina</i>								298,34	238,82	25,16	

Tabela 22 - Substâncias quantificadas por LC-MS/MS em amostras referentes ao Rio Sapucaí-Guaçu

Rio Sapucaí-Guaçu	2015						2016					
	Fev	Abr	Jun	Ago	Out	Dez	Fev	Abr	Jun	Ago	Out	Dez
<i>Cafeína</i>	2262,00	242,60	1435,00	1061,00	661,00	909,50	1274,31	10302,84	15914,75	14417,66	14940,91	42843,81
<i>Fipronil</i>				0,70								
<i>Carbendazim</i>	29,00	9,40	23,50	12,50	18,00	6,15	40,93		7,57	6,41	11,92	6,43
<i>Tebutiuron</i>	16,33											
<i>Atrazina</i>	15,00											
<i>Diuron</i>		9,55	32,50	21,00	8,85	4,90						
<i>Malation</i>	14,00	5,35	4,75	5,25	3,85	3,00						
<i>Tebuconazole</i>		0,30		0,30	0,30							
<i>Estrona</i>		2,40		1,30	1,20	1,00		63,10	59,48	55,92	53,61	
<i>Estradiol</i>								29,56	39,00	56,52	37,17	
<i>Estriol</i>										92,19		
<i>Etinilestradiol</i>								54,84	50,31	62,08	50,76	
<i>Bisfenol A</i>		3,80	3,70	11,65	4,20	4,20		55,90	138,05	78,13	121,59	
<i>Octilfenol</i>								69,04	68,05	68,97	68,39	
<i>Nonilfenol</i>								57,91	58,24		59,17	
<i>2,4-D</i>			8,25	3,45	9,05	3,25		25,51	30,21	33,94	25,12	

9.2 Dados brutos *Fish Embryo Toxicity*

Tabela 23 – Dados brutos FET Rio Araras

Rio Araras				Controle - Rio Araras			
2015				2015			
FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito	FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito
TC	2	9	29	NT	0	1	39
	1	11	28		0	1	39
	3	15	22		0	2	38
NT	1	2	37	NT	0	0	40
	0	0	40		0	0	40
	0	1	39		0	0	40
TA	3	11	26	NT	1	2	37
	4	9	27		1	3	36
	6	7	27		0	2	38
TA	4	8	28	NT	1	3	36
	5	3	32		1	2	37
	3	5	32		0	3	37
TC	0	1	39	NT	0	0	40
	1	4	35		0	2	38
	1	4	35		0	1	39

2016				2016			
FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito	FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito
TA	6	8	26	NT	0	0	40
	6	5	29		0	1	39
	4	9	27		1	2	37
TC	1	4	35	NT	1	0	39
	1	5	34		0	1	39
	0	6	34		0	0	40
TC	2	10	28	NT	0	0	40
	1	7	32		0	1	39
	0	5	35		0	1	39
NT	0	0	40	NT	0	1	39
	0	0	40		0	0	40
	0	1	39		0	2	38

Tabela 24 - Dados brutos FET Ribeirão Pires

Ribeirão Pires				Controle – Ribeirão Pires			
2015				2015			
FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito	FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito
TC	1	4	35		0	1	39
	2	7	31	NT	0	1	39
	1	11	28		0	2	38
NT	0	0	40		0	0	40
	0	0	40	NT	0	0	40
	1	0	39		0	0	40
TA	4	17	19		1	2	37
	7	7	26	NT	1	3	36
	12	8	20		0	2	38
TA	9	21	10		1	3	36
	7	19	14	NT	1	2	37
	13	17	10		0	3	37
2016				2016			
FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito	FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito
TA	9	14	17		0	0	40
	7	11	22	NT	0	1	39
	15	19	6		1	2	37
TA	12	13	15		1	0	39
	15	9	16	NT	0	1	39
	9	7	24		0	0	40
TA	8	12	20		0	0	40
	17	13	10	NT	0	1	39
	11	16	13		0	1	39
TA	15	7	17		0	1	39
	9	4	27	NT	0	0	40
	13	11	16		0	2	38
TC	3	18	19		0	0	40
	2	21	17	NT	0	0	40
	5	15	20		0	1	39

Tabela 25 - Dados brutos FET Reservatório Cascata

Reservatório Cascata				Controle – Reservatório Cascata			
2015				2015			
FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito	FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito
	1	0	39		0	1	39
NT	0	2	38	NT	0	1	39
	0	2	38		0	2	38
2016				2016			
FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito	FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito
	4	10	26		0	0	40
TC	3	7	30	NT	0	1	39
	1	5	34		1	2	37
	0	2	38		1	0	39
NT	0	1	39	NT	0	1	39
	1	0	39		0	0	40
	0	0	40		0	0	40
NT	0	0	40	NT	0	1	39
	0	0	40		0	1	39

Tabela 26 - Dados brutos FET Rio Jaguari

Rio Jaguari				Controle – Rio Jaguari			
2015				2015			
FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito	FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito
	1	7	32		0	1	39
TC	2	14	24	NT	0	1	39
	1	9	30		0	2	38
	1	9	30		0	0	40
TC	1	12	27	NT	0	0	40
	0	15	25		0	0	40
	9	6	25		1	2	37
TA	13	5	22	NT	1	3	36
	23	7	10		0	2	38
2016				2016			
FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito	FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito
	0	2	38		0	0	40
NT	0	3	37	NT	0	1	39
	1	1	38		1	2	37
	0	13	27		1	0	39
TC	0	9	31	NT	0	1	39
	1	17	22		0	0	40

	0	13	27
TC	1	9	30
	2	7	31
	0	0	40
NT	0	1	39
	1	0	39

	0	0	40
NT	0	1	39
	0	1	39
	0	1	39
NT	0	0	40
	0	2	38

Tabela 27 - Dados brutos FET Rio Piracicaba

Rio Piracicaba			
2015			
FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito
	1	12	27
TC	2	9	29
	1	13	26
	9	4	27
TA	4	11	25
	12	19	9
	1	7	32
TA	2	13	25
	0	9	31

Controle – Rio Piracicaba			
2015			
FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito
	0	1	39
NT	0	1	39
	0	2	38
	0	0	40
NT	0	0	40
	0	0	40
	1	2	37
NT	1	3	36
	0	2	38

2016			
FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito
	0	1	39
NT	0	0	40
	0	0	40

2016			
FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito
	0	1	39
NT	0	0	40
	0	2	38

Tabela 28 - Dados brutos FET Ribeirão Grande

Ribeirão Grande			
2015			
FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito
TC	3	9	28
	1	14	15
	2	5	33
TC	1	19	20
	2	8	30
	3	15	22
TC	0	14	26
	1	17	22
	2	15	23
TC	1	13	26
	0	9	31
	1	21	18

Controle – Ribeirão Grande			
2015			
FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito
NT	0	1	39
	0	1	39
	0	2	38
NT	0	0	40
	0	0	40
	0	0	40
NT	1	2	37
	1	3	36
	0	2	38
NT	1	3	36
	1	2	37
	0	3	37

2016			
FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito
NT	0	1	39
	0	2	38
	1	0	39
NT	1	1	38
	0	0	40
	2	0	38
TC	1	11	28
	2	9	29
	0	12	28

2016			
FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito
NT	0	0	40
	0	1	39
	1	2	37
NT	1	0	39
	0	1	39
	0	0	40
NT	0	0	40
	0	1	39
	0	1	39

Tabela 29 - Dados brutos FET Rio Sapucaí-Guaçu

Rio Sapucaí-Guaçu			
2015			
FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito
NT	0	0	40
	0	0	40
	0	1	39
TC	1	7	32
	2	9	31
	0	12	28
TA	7	11	22
	13	8	19
	9	10	21
TA	19	6	15
	15	9	16
	9	7	22
NT	0	0	40
	0	0	40
	0	1	39

Controle – Rio Sapucaí-Guaçu			
2015			
FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito
NT	0	1	39
	0	1	39
	0	2	38
NT	0	0	40
	0	0	40
	0	0	40
NT	1	2	37
	1	3	36
	0	2	38
NT	1	3	36
	1	2	37
	0	3	37
NT	0	0	40
	0	2	38
	0	1	39

2016			
FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito
TA	9	12	19
	12	7	21
	17	9	14
TA	13	8	19
	9	11	20
	18	6	24
NT	0	0	40
	0	0	40
	1	0	39
NT	1	0	39
	0	2	38
	2	1	37
NT	0	0	40
	0	0	40
	0	0	40

2016			
FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito
NT	0	0	40
	0	1	39
	1	2	37
NT	1	0	39
	0	1	39
	0	0	40
NT	0	0	40
	0	1	39
	0	1	39
NT	0	1	39
	0	0	40
	0	2	38
NT	0	1	39
	0	0	40
	0	0	40

Tabela 30 - Dados brutos FET Reservatório Guarapiranga

Reservatório Guarapiranga				Controle – Res. Guarapiranga			
2015				2015			
FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito	FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito
NT	0	0	40		0	1	39
	0	0	40	NT	0	1	39
	0	1	39		0	2	38
TC	4	12	24		0	0	40
	2	10	28	NT	0	0	40
	1	8	31		0	0	40
NT	0	1	39		1	2	37
	0	1	39	NT	1	3	36
	1	0	39		0	2	38

Tabela 31 - Dados brutos FET Rio São Miguel Arcanjo

Rio São Miguel Arcanjo				Controle – Rio São Miguel Arcanjo			
2016				2016			
FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito	FET	Letais	Sub-letais	Nenhum efeito
NT	0	0	40		0	0	40
	0	1	39	NT	0	1	39
	0	0	40		1	2	37
NT	0	0	40		1	0	39
	1	1	38	NT	0	1	39
	0	2	38		0	0	40
NT	1	0	39		0	0	40
	1	2	37	NT	0	1	39
	0	1	39		0	1	39

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

**O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada
à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela
Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do
Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.**