



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

Avaliação da Atividade Glicocorticogênica em Águas Superficiais do Estado de São Paulo

RENAN LOURENÇO DE OLIVEIRA SILVA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

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

**São Paulo
2021**

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

Avaliação da Atividade Glicocorticogênica em Águas Superficiais do
Estado de São Paulo

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

RENAN LOURENÇO DE OLIVEIRA SILVA

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Materiais

Orientador:

Prof. Dr. José Roberto Rogero

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Como citar:

SILVA, R. L. d. O. **Avaliação da Atividade Glicocorticogênica em Águas Superficiais do Estado de São Paulo**. 2021. 88 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP, com os dados fornecidos pelo (a) autor (a)

Silva, Renan Lourenço de Oliveira
Avaliação da Atividade Glicocorticogênica em Águas Superficiais do Estado de São Paulo / Renan Lourenço de Oliveira Silva; orientador José Roberto Rogero. -- São Paulo, 2021.
88 p.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Materiais) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2021.

1. Bioensaios. 2. Contaminantes Emergentes. 3. Fármacos. 4. Glicocorticoides. 5. GR-CALUX. I. Rogero, José Roberto,

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Renan Lourenço de Oliveira Silva

Título: Avaliação da Atividade Glicocorticogênica em Águas Superficiais do Estado de São Paulo

Dissertação apresentada no Programa de Pós-graduação em Tecnologia Nuclear da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Dedico este trabalho a minha família, todo
amor e gratidão.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e minha irmã, minha grande pequena família, pelo companheirismo e apoio durante toda minha trajetória. Sem esse lar nada disso teria sido possível.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Roberto Rogero pelo apoio e orientação e por aceitar esse desafio comigo. Estendo meus agradecimentos a toda equipe do Laboratório de Ecotoxicologia do CQMA – IPEN, em especial a Sizue, pela atenção, colaboração e acolhimento no laboratório.

Ao Dr. Gilson Alves Guinágua pelo convite e oportunidade de desenvolver esse trabalho em parceria com o Laboratório de Toxicologia Ambiental da CETESB e também pelas conversas e incentivos ao longo desse caminho.

À Msc. Daniela Dayrell França pela execução dos bioensaios, pela paciência e disponibilidade em compartilhar seu conhecimento.

Aos meus gerentes, Dr. Maria Inês Zanoli Sato e Biól. Carlos Jesus Brandão, pelo apoio e ensinamentos durante todos os anos de CETESB.

À CETESB, em especial à Diretoria de Engenharia e Qualidade Ambiental, pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional.

À minha amiga Msc. Daniela Barbati Osório pelo carinho, incentivo e pela ajuda nos momentos finais da dissertação.

Aos meus amigos e parceiros do coração que sempre estiveram comigo e que trouxeram tantas alegrias e momentos leves que ajudaram muito nessa jornada.

“Há água suficiente para satisfazer as crescentes necessidades do mundo, mas não sem mudar a forma de geri-la.” (ONU)

RESUMO

SILVA, R. L. d. O. **Avaliação da Atividade Glicocorticogênica em Águas Superficiais do Estado de São Paulo**. 2021. 88 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

O monitoramento da qualidade dos ambientes aquáticos é uma importante ferramenta para o diagnóstico da qualidade da água com vistas à proteção da saúde da população, manutenção do equilíbrio ecológico e ao desenvolvimento de ações de recuperação de corpos hídricos já comprometidos por atividades antrópicas. A inclusão de contaminantes emergentes, muitos dos quais atingem os corpos d'água por meio de descargas de esgotos domésticos, nos programadas de monitoramento é fundamental para a avaliação da real qualidade dos recursos hídricos e entendimento sobre os possíveis efeitos desses compostos no ambiente. O objetivo desse estudo foi investigar a ocorrência de glicocorticoides em águas superficiais do Estado de São Paulo por meio do bioensaio *in vitro* GR-CALUX e avaliar possíveis correlações com atividade estrogênica e outros parâmetros indicadores de contaminação por esgotos com o intuito de direcionar futuras escolhas de novos pontos de monitoramento para esse parâmetro. Entre 2018 e 2020 foram avaliados 19 pontos de coleta, entre rios e reservatórios, totalizando 70 ensaios para atividade glicocorticogênica. Embora a maior parte dos resultados obtidos esteja abaixo do limite de quantificação do método, na ordem de ng eq. Dexametasona.L⁻¹, os pontos Rio Capivari, Ribeirão Pires, Ribeirão Preto e Ribeirão dos Meninos apresentaram resultados quantificáveis entre 2,2 e 44 ng eq. Dexametasona.L⁻¹. Foram identificadas correlações diretas com os parâmetros nitrogênio amoniacal, nitrogênio *kjeldahl* total, fósforo, *Escherichia Coli*, carbono orgânico total, demanda bioquímica de oxigênio e atividade estrogênica e correlação inversa com os resultados para oxigênio dissolvido, corroborando a ligação entre a presença dessa classe de fármacos com o lançamento de esgotos nos corpos d'água. O agrupamento dos locais estudados de acordo com os resultados obtidos pode ser usado como base para escolha de futuros locais de amostragem e investigação da ocorrência de atividade glicocorticogênica em outros corpos d'água. Embora os efeitos imediatos na saúde humana sejam improváveis, a presença ambiental de compostos glicocorticogênicos na faixa de ng.L⁻¹ indica a necessidade de estudos mais detalhados para o estabelecimento da identidade dos compostos ativos, identificação e compreensão dos efeitos ecotoxicológicos crônicos e avaliação os riscos humanos e ecológicos envolvidos.

Palavras-chave: bioensaios, contaminantes emergentes, fármacos, glicocorticoides, GR-CALUX

ABSTRACT

SILVA, R. L. d. O. **Avaliação da Atividade Glicocorticogênica em Águas Superficiais do Estado de São Paulo**. 2021. 88 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

Water quality monitoring is an important tool for diagnosing water quality with a view to protecting the health of the population, maintaining ecological balance and developing actions to recover waterbodies already compromised by human activities. The inclusion of emerging contaminants, many of which reach surface water by discharging domestic sewage, in the monitoring programs is essential for understanding the real quality of water resources and understanding the possible effects of these compounds on the environment. The aim of this study was to investigate the occurrence of glucocorticoids in surface waters of the State of São Paulo using the in vitro bioassay GR-CALUX and to evaluate possible correlations with estrogenic activity and others sewage pollution indicators in order to direct future selections of new monitoring sites. Between 2018 and 2019, 19 sampling locations were evaluated, including rivers and reservoirs, totaling 70 tests for glucocorticogenic activity. Most of the results obtained were below the limit of quantification of the method (LOD), in the order of ng eq. Dexamethasone.L⁻¹, however Rio Capivari, Ribeirão Pires, Ribeirão Preto and Ribeirão dos Meninos have presented quantifiable results between 2.2 and 44 ng eq. Dexamethasone.L⁻¹. There were identified direct correlations with the parameters ammoniacal nitrogen, total kjeldahl nitrogen, phosphorus, *Escherichia Coli*, total organic carbon, biochemical oxygen demand and estrogenic activity and inverse correlation with the results for dissolved oxygen, corroborating the link between the presence of this class of drugs with the release of sewage into water bodies. The clustering of the studied sites according to the results obtained can be used as a basis for choosing future sampling locations and investigating the occurrence of glucocorticogenic activity in other water bodies. Although the immediate effects on human health are unlikely, the environmental presence of glucocorticogenic compounds in the range of ng.L⁻¹ indicates the need for further studies to establish the identity of the active compounds, identify and understand chronic ecotoxicological effects and assess the human and ecological risks involved.

Key-words: bioassay, emerging contaminants, drugs, glucocorticoids, GR-CALUX

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas de alguns GCs.....	27
Tabela 2 – Publicações sobre ocorrência de GCs em ambientes aquáticos.....	29
Tabela 3 – Potenciais tóxicos de diferentes GCs.....	32
Tabela 4 – Informações dos locais de amostragem	43
Tabela 5 – Métodos de análise dos parâmetros indicadores de qualidade da água	47
Tabela 6 – Estatística descritiva - Resultados de AG (Dados Brutos).....	50
Tabela 7 – Estatística descritiva - Resultados de AG (Dados Transformados)	51
Tabela 8 – Caracterização dos clusters segundo cada uma das variáveis	66
Tabela 9 – Resultados do ajuste final para o modelo de previsão da AG	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Problemas globais de qualidade da água.....	19
Figura 2– Número de fármacos detectados em água superficial, água subterrânea e água para consumo humano.....	21
Figura 3 – Fontes e rotas de fármacos no meio ambiente.....	23
Figura 4 – Estrutura genérica dos GCs	26
Figura 5 – Princípio do teste CALUX	31
Figura 6 – Esquema do bioensaio BLYES	33
Figura 7 – Mapa de localização dos pontos de amostragem.....	42
Figura 8 – Etapa de extração por SPE	45
Figura 9 – Frasco de cultivo celular e incubadora de CO ₂	45
Figura 10 – Exposição das células à amostra (esquerda) e luminômetro (direita).....	46
Figura 11 – Resultado do teste comparativo das medianas de GR-CALUX por ponto de coleta	53
Figura 12 – Resultado do teste comparativo das medianas de GR-CALUX nos ambientes lêntico e lótico	54
Figura 13 – Resultados do teste comparativo das medianas de GR-CALUX nos anos 2018, 2019 e 2020	55
Figura 14 – Matriz de correlações de <i>Spearman</i> com os dados originais.....	56
Figura 15 – Matriz de correlações de <i>Spearman</i> após tratamento dos dados ausentes	57
Figura 16 – Matriz de correlação - Ambiente Lêntico	58
Figura 17 – Matriz de correlação - Ambiente Lótico	59
Figura 18 – Zonas de confiança para o tipo de ambiente aquático.....	60
Figura 19 – Zonas de confiança para os pontos de coleta	60
Figura 20 – Pontos de coleta segundo os resultados da primeira e terceira componentes principais.....	61
Figura 21 – Zonas de confiança para os anos de 2018, 2019 e 2020.....	62
Figura 22 – Contribuição dos parâmetros para a primeira componente principal.....	62
Figura 23 – Contribuição dos parâmetros para a terceira componente principal.....	63
Figura 24 – Correlações projetadas na primeira e terceira componentes principais.....	63
Figura 25 – <i>Heatmap</i> apresentando todos os resultados de todas as amostras	64
Figura 26 – Determinação do número de <i>clusters</i>	65
Figura 27 – Dendograma de identificação de <i>cluster</i>	65
Figura 28 – Histograma e distribuição Gamma generalizada ajustada aos dados.....	66
Figura 29 – Controle de qualidade do modelo ajustado usando GAMLSS.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

AE: Atividade Estrogênica
AG: Atividade Glicocorticogênica
ANA: Agência Nacional de Águas e Saneamento
YES: *Yeast Estrogen Screen*
BLYES: *Bioluminescet Yeast Estrogen Assay*
CETESB: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente
COT: Carbono Orgânico Total
DAEE: Departamento de Águas e Energia Elétrica do Estado de São Paulo
DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio
DEX: Dexametasona
DMEM: *Dubelco´s Modified Eagle´s Medium*
ETE: Estação de Tratamento de Esgoto
ETA: Estação de Tratamento de Água
FAMD: *Factor Analysis of Mixed Data*
GAMLSS: *Generalized Additive Model for Location, Scale and Shape*
GC: Glicocorticoide
GR-CALUX: *Glucocorticoid Receptor – Chemical Activated Luciferase Gene Expression*
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IE: Interferente Endócrino
IFA: Ingrediente Farmacêutico Ativo
IPCS: *International Programme on Chemical Safety*
IQA: Índice de Qualidade das Águas
LQ: Limite de Quantificação
NKT: Nitrogênio *Kjeldahl* Total
OD: Oxigênio Dissolvido
OECD: *Organization for Economic Cooperation and Development*
PCA: *Principal Component Analysis*
PCP: Produto de Cuidado Pessoal

PNRH: Política Nacional de Recursos Hídricos

POP: Poluente Orgânico Persistente

SAAE: Serviço Autônomo de Água e Esgoto

SABESP: Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo

SEMAE: Serviço Municipal Autônomo de Água e Esgoto

SPE: *Solid Phase Extraction*

ST: Sólidos Totais

UBA: *Umweltbundesamt*

USEPA: *United States Environmental Protection Agency*

USGS: *United States Geological Survey*

WHO: *World Health Organization*

WQA: *Water Quality Association*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	Objetivos Específicos.....	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1	Águas Superficiais e Legislação Ambiental.....	18
3.2	Contaminantes Emergentes.....	19
3.3	Ocorrência de Fármacos em Ambientes Aquáticos.....	20
3.4	Interferentes Endócrinos.....	24
3.5	Glicocorticoides.....	25
3.6	Bioensaios.....	30
3.6.1	Atividade Glicocorticogênica (AG) e GR-CALUX.....	30
3.6.2	Atividade Estrogênica (AE) e BLYES.....	32
3.7	Indicadores de qualidade das águas.....	34
3.7.1	Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO).....	34
3.7.2	Carbono Orgânico Total (COT).....	35
3.7.3	<i>Escherichia Coli</i> (<i>E. Coli</i>).....	36
3.7.4	Fósforo Total.....	36
3.7.5	Nitrogênio.....	36
3.7.6	Oxigênio Dissolvido (OD).....	38
3.7.7	pH.....	39
3.7.8	Sólidos Totais (ST).....	39
3.7.9	Temperatura.....	40
3.7.10	Turbidez.....	40
4	METODOLOGIA.....	40
4.1	Locais de Amostragem.....	41
4.2	Metodologia de Coleta.....	44
4.3	Atividade Glicocorticogênica (AG).....	44
4.3.1	Preparo da Amostra.....	44
4.3.2	Cultivo Celular.....	45
4.3.3	GR-CALUX.....	46
4.4	Ensaio para os Indicadores de Qualidade da Água.....	46
4.5	Análises Estatísticas e Apresentação dos Dados.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49

5.1	Atividade Glicocorticogênica	49
5.2	Correlação com Atividade Estrogênica e Indicadores de Qualidade de Água	56
6	CONCLUSÕES.....	69
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
8	APÊNDICES	84
	APÊNDICE A – Dados Transformados incluindo dados estimados (em vermelho).....	84
	APÊNDICE B – Resultados da modelagem GAMLSS	87

1 INTRODUÇÃO

A água é um elemento fundamental para a perpetuação da vida, participando dos processos metabólicos que acontecem em todos os seres vivos. Além de sua importância biológica, possui ainda função social e econômica uma vez que é utilizada para transporte, recreação, produção de energia e outras atividades imprescindíveis para as civilizações (OLIVEIRA, 2010).

A manutenção da qualidade da água está prevista na Política Nacional de Recursos Hídricos (PNRH) que tem como um de seus objetivos “assegurar à atual e às futuras gerações a necessária disponibilidade de água, em padrões de qualidade adequados aos respectivos usos” (BRASIL, 1997).

Os processos de urbanização e o crescimento populacional nos últimos anos levaram a um aumento de pressão sobre as reservas de água no mundo, significando, ao mesmo tempo, um aumento diretamente proporcional da poluição nesses ambientes, diminuindo ainda mais a quantidade de água com qualidade adequada disponível.

Qualidade da água é um termo dinâmico e relativo pois depende dos objetivos do seu uso, de forma que a qualidade da água pode ser definida, para fins específicos, como o conjunto de características físicas, químicas e biológicas adequadas a sua utilização para determinado fim.

Para cada uso da água, portanto, é necessário estabelecer as exigências relativas à sua qualidade, isto é, definir parâmetros de qualidade e estabelecer os seus valores-limite (MENDES, 2010).

A classificação das águas superficiais é dada com base em valores de algumas características físicas, químicas e biológicas. Assim, por meio do monitoramento de variáveis de qualidade, principalmente para aqueles que fornecem água para a população, é possível evitar maiores problemas à saúde pública e desenvolver ações de recuperação dos corpos hídricos já fortemente impactados por ações antrópicas consideradas deletérias (LIMA, 2001).

Uma série de poluentes de ocorrência natural ou de origem antrópica, bióticos ou abióticos, e que podem apresentar algum risco ao ecossistema e à saúde humana não estão incluídos em programas de monitoramento de rotina e tão pouco são legislados. Trata-se dos chamados contaminantes emergentes, que podem se tornar candidatos para legislações futuras dependendo de pesquisas sobre (eco)toxicidade, efeitos sobre a saúde humana, percepção pelo público e dados sobre sua ocorrência em vários compartimentos ambientais (MONTAGNER *et al.*, 2017; USEPA, 1997; USGS, 2012).

Os fármacos constituem uma das classes de contaminantes emergentes mais estudadas em todo mundo e a segunda mais estudada no Brasil, pois são constantemente lançados no ambiente em grandes quantidades, além de serem produzidos com a finalidade de apresentarem efeitos biológicos (MONTAGNER *et al.*, 2017).

Esse grupo de compostos inclui medicamentos consumidos com ou sem prescrição médica, de uso humano ou veterinário, e também suplementos alimentares. Devido à estrutura química, muitos são persistentes e lipofílicos e podem ser lançados no meio ambiente, na sua forma original ou metabolizada, de forma a causar possíveis efeitos indesejados à biota e ao homem (MONTAGNER *et al.*, 2017).

Nas últimas décadas houve um aumento significativo no consumo de medicamentos em todo mundo, inclusive no Brasil, e a presença de fármacos em amostras ambientais tem sido reportada desde a década de 1970 em concentrações de nanograma por litro a miligrama por litro (QUADRA *et al.*, 2016; HIGNITE e AZARNOFF; 1977, KEITH, 1976).

Uma grande atenção é dada aos fármacos de origem hormonal, pois são potenciais interferentes endócrinos; definidos como substâncias, ou mistura de substâncias, que em baixas concentrações podem interferir no funcionamento natural do sistema endócrino de espécies animais, incluindo os seres humanos, e conseqüentemente causar efeitos adversos em um organismo saudável, ou em sub-descendentes ou ainda em sub-populações (GHISELLI e JARDIM, 2007; IPCS, 2002; MONTAGNER *et al.*, 2017).

Os interferentes endócrinos são também chamados de compostos estrogênicos quando desencadeiam resposta biológica chamada estrogenicidade ou atividade estrogênica, via ativação dos receptores estrogênicos ou por outro mecanismo de ação (SANSEVERINO *et al.*, 2009). A quantificação da atividade estrogênica pode ser realizada por meio de bioensaios que comparam o efeito observado nas amostras com efeitos frente a uma substância referência como o 17 β -estradiol (ROCHA, 2012; LOPES, 2016; MARTINI, 2018).

Glicocorticoides são substâncias que fazem parte de um grupo de anti-inflamatórios esteroidais com importantes funções fisiológicas. Para peixes e outros vertebrados, glicocorticoides naturais, como o cortisol, regulam o desenvolvimento e o envelhecimento, além de exercerem um papel crítico na adaptação bem-sucedida ao estresse (CHANG *et al.*, 2007). Estão entre os fármacos mais frequentemente prescritos, utilizados em quantidades bem maiores que estrogênios e androgênios, recomendadas para tratamentos de doenças inflamatórias e imunes, incluindo asma, reumatismo, alergias, inflamações intestinais, doenças dos olhos e da pele. Mais recentemente têm sido utilizados no tratamento de quadros clínicos associados à COVID-19 (MACIKOVA *et al.*, 2014; TARAZONA *et al.*, 2021).

Estudos demonstraram potenciais efeitos ecotoxicológicos desses compostos em peixes; tratamentos contínuos com cortisol (dieta) têm sido relacionados com inibição de locomoção, comportamento agressivo e influência em respostas imunológicas (HALPENNY *et al.*, 2002; QVERLI *et al.*, 2002).

A principal via de introdução de interferentes endócrinos em águas superficiais no Brasil está relacionada ao descarte de efluente bruto, uma vez que 36 municípios nas 100 maiores cidades do país têm menos de 60% da população com coleta de esgoto e apenas 46% dos esgotos são tratados (IBGE, 2020; BRASIL, 2019).

Os processos convencionais de tratamento, tanto de água quanto de esgoto, não são eficientes para remoção de muitas substâncias poluidoras, entre elas os contaminantes emergentes, devido principalmente às características físicas e químicas das mesmas, como polaridade (STACKELBERG *et al.*, 2007, WANG *et al.*, 2011).

Uma das ferramentas para a identificação dos glicocorticoides em matrizes ambientais é o bioensaio *in vitro* GR-CALUX (*Glucocorticoid Receptor – Chemical Activated Luciferase Gene Expression*). Nesse ensaio, a medição da atividade glicocorticogênica (AG) de amostras ambientais é realizada por meio de uma linhagem de células geneticamente modificadas para responderem à presença de substâncias, ou misturas de substâncias, que ativem glicoreceptores e emitirem luz de intensidade proporcional à concentração desses compostos. A expressão dos resultados é baseada em uma curva dose-resposta sigmoideal construída a partir de dexametasona (composto de referência) e reportada em nanograma equivalente de dexametasona por litro (ng eq. DEX.L⁻¹). As linhagens de células GR-CALUX foram fornecidas pela empresa *BioDetection Systems*, sediada em Amsterdã na Holanda.

A identificação e quantificação de substâncias suspeitas de causarem interferência endócrina e, por consequência, uma série de possíveis efeitos tóxicos aos seres humanos e à vida aquática, têm sido descritas em escala mundial, porém em relação aos compostos anti-inflamatórios essas informações ainda são bastante restritas ou ainda inexistentes, no caso do Brasil. É de extrema importância o conhecimento da atual situação dos corpos d'água quanto a presença de glicocorticoides para direcionar futuros estudos ecotoxicológicos, toxicológicos e, então, propostas de legislação.

O presente estudo investigou a presença de atividade glicocorticogênica em 14 rios e 5 reservatórios no Estado de São Paulo.

2 OBJETIVOS

O presente estudo visou à identificação e quantificação da atividade glicocorticogênica em águas superficiais do Estado de São Paulo.

2.1 Objetivos Específicos

- Investigar os pontos da Rede Básica de Monitoramento das Águas Superficiais do Estado de São Paulo, operada pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), em relação à ocorrência de glicocorticoides, por meio do bioensaio *in vitro* GR-CALUX.

- Avaliar possíveis correlações entre atividade glicocorticogênica, atividade estrogênica, parâmetros indicadores de contaminação por esgotos do índice de qualidade das águas (IQA) e carbono orgânico total em ambientes lênticos e lóticos.

- Estabelecer, por meio de técnicas estatísticas, direcionamento para escolha de novos pontos de monitoramento para atividade glicocorticogênica.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Águas Superficiais e Legislação Ambiental

Na natureza, o ciclo hidrológico é o mecanismo que compreende as mudanças de estado físico e o contato da água com diferentes ambientes; dentro das etapas do ciclo é conferida uma natureza química à água. As características da água natural estão determinadas pelas substâncias químicas nela dissolvidas, diretamente relacionadas com a geoquímica do solo e das rochas nas bacias hidrográficas que drenam os rios e lagos (DREVER, 1988; VON SPERLING, 2007).

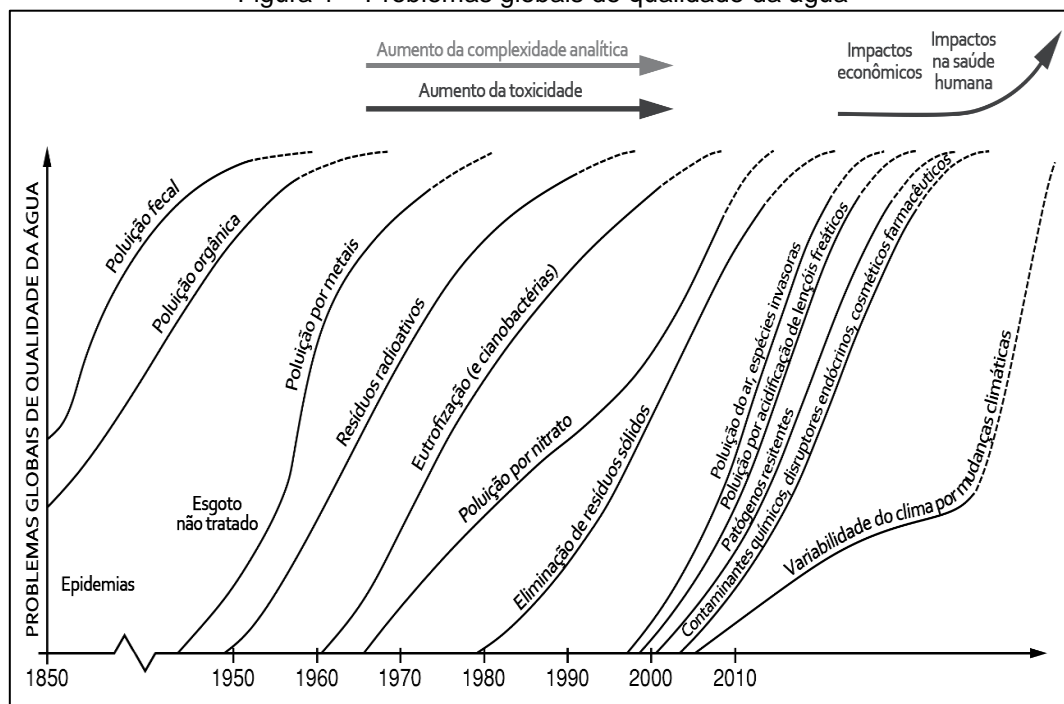
O tipo de poluição varia de acordo com o uso e ocupação do solo de uma dada bacia hidrográfica. Geralmente, o uso e o manejo de terras agrícolas têm forte influência sobre as concentrações de nutrientes na água, como o nitrogênio e o fósforo (BU *et al.*, 2014; NGOYE e MACHIWA, 2004; WOLI *et al.*, 2004). Já em áreas urbanas e industriais o uso e a ocupação do solo têm sido associados com a poluição orgânica e com poluição por metais pesados e nutrientes (KANG *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2009).

As preocupações relacionadas às características dos poluentes não são fixas e variam ao longo do tempo, com tendência para aumento da complexidade analítica, toxicidade e dos impactos à saúde humana e à economia. Nos últimos anos, por exemplo, houve um aumento da preocupação a respeito da poluição pelos chamados poluentes orgânicos persistentes (POPs) e contaminantes emergentes (Figura 1).

No Brasil, os critérios mínimos de qualidade das águas brutas superficiais estão definidos na Resolução CONAMA (Conselho Nacional de Meio Ambiente) nº 357 de 17 de março de 2005 e em suas modificações. O documento contempla características físicas, químicas, organolépticas, biológicas e toxicológicas (BRASIL, 2005).

Apesar do aumento do número de pesquisas e discussões relativas à ocorrência de contaminantes emergentes em matrizes ambientais, e também acerca de diretrizes e protocolos para avaliação de efeitos agudos e crônicos na biota aquática, não existe ainda uma legislação nacional contemplando esse tipo de composto (MARTINI, 2018).

Figura 1 – Problemas globais de qualidade da água



Fonte: Traduzido de TUNDISI *et al.* (2015)

3.2 Contaminantes Emergentes

Contaminantes emergentes são poluentes cuja ocorrência no meio ambiente tem sido investigada de forma mais abrangente somente a partir do final da década de 1990 devido à falta de métodos analíticos sensíveis o suficiente para detecção em baixíssimas concentrações (na ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$) em amostras ambientais (NOGUERA-OVIEDA e AGA, 2016).

Trata-se de centenas de compostos que têm sido detectados nos diferentes compartimentos ambientais (solo, água e ar) e que podem ser de origem antrópica ou natural. Porém, apesar de poderem apresentar algum risco ao ecossistema, ainda não estão incluídos em programas de monitoramento de rotina e tampouco são legislados (MONTAGNER *et al.*, 2017)

De acordo com NOGUERA-OVIEDA e AGA (2016), MONTAGNER e colaboradores (2017) e *Water Quality Association* (WQA) dos Estados Unidos (2017), os fármacos, produtos para cuidados pessoais (PCPs) e interferentes endócrinos (IEs) são alguns dos principais exemplos de contaminantes emergentes.

Os IEs referem-se a compostos naturais e sintéticos com potencial de causarem efeitos adversos à saúde ambiental e humana, interferindo no funcionamento do sistema endócrino (SUMPTER, 2005; CAMPBELL *et al.*, 2006; USEPA, 2008).

Muitos dos efeitos são atribuídos a exposição crônica a esses compostos que ocorrem em concentrações extremamente baixas, principalmente em

matrizes aquáticas, na ordem de nanograma a picograma por litro, o que torna ainda mais complexa a análise de avaliação de risco, seja considerando a preservação da vida aquática, dessedentação de animais, recreação ou saúde humana (MONTAGNER *et al.*, 2017).

Considerando o aumento significativo de novos compostos químicos, incluindo novos fármacos, e o potencial de desregulação endócrina não ser prontamente determinado a partir de características estruturais dessas novas moléculas, a demanda por identificação e monitoramento de interferentes endócrinos é de grande importância (DIAMANTI-KANDARAKIS *et al.*, 2009; WANG, 2016).

3.3 Ocorrência de Fármacos em Ambientes Aquáticos

Fármacos são compostos químicos, sintéticos ou naturais, com estrutura definida, produzidos para uso humano ou veterinário, para consumo com ou sem prescrição médica, e que contém ingredientes ativos que foram desenvolvidos para produzir efeitos farmacológicos e conferir uma série de benefícios para o organismo receptor (OGA *et al.*, 2008; OECD, 2019).

Segundo publicação de BURNS e colaboradores (2018), cerca de 2000 ingredientes farmacêuticos ativos (IFAs) são administrados mundialmente, incluindo medicamentos de venda livre e remédios veterinários. Os IFAs compreendem uma variedade de moléculas produzidas por indústrias farmacêuticas, atingindo a marca de 100 mil toneladas por ano e constantes aumentos anuais de desenvolvimentos e aprovações de novos compostos (WEBER *et al.*, 2014; MULLARD, 2019).

O crescimento e envelhecimento da população, aumento em investimentos no setor de saúde em países industrializados, avanços em pesquisa e desenvolvimento e disponibilidade global levaram a um aumento significativo no consumo de fármacos (AUS DER BEEK, 2016; OECD, 2019).

Fármacos de uso humano e de uso veterinário, seus metabólitos e produtos de transformação estão presentes nos corpos d'água. Esses e outros produtos farmacêuticos chegam ao ambiente como consequência da produção e formulação farmacêutica, uso pela população em geral, uso em produção de alimentos e descarte inapropriado. Depois de passar pelo corpo humano ou animal, os IFAs são excretados em sua forma ativa inalterada ou como metabólitos, que podem ser ativos ou inativos, e têm o potencial para posterior decomposição em vários produtos de transformação em estações de tratamento de água e esgoto ou no próprio meio ambiente (CALIMAN e GAVRILESCO, 2009; OECD, 2019).

Uma série de estudos demonstram que Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) com processos secundários não são eficientes na remoção de uma série de compostos orgânicos. Segundo levantamento realizado por NOGUERA-OVIEDO (2016), processos de tratamento de esgoto por lodo ativado, por exemplo, que é o sistema de tratamento amplamente utilizado em

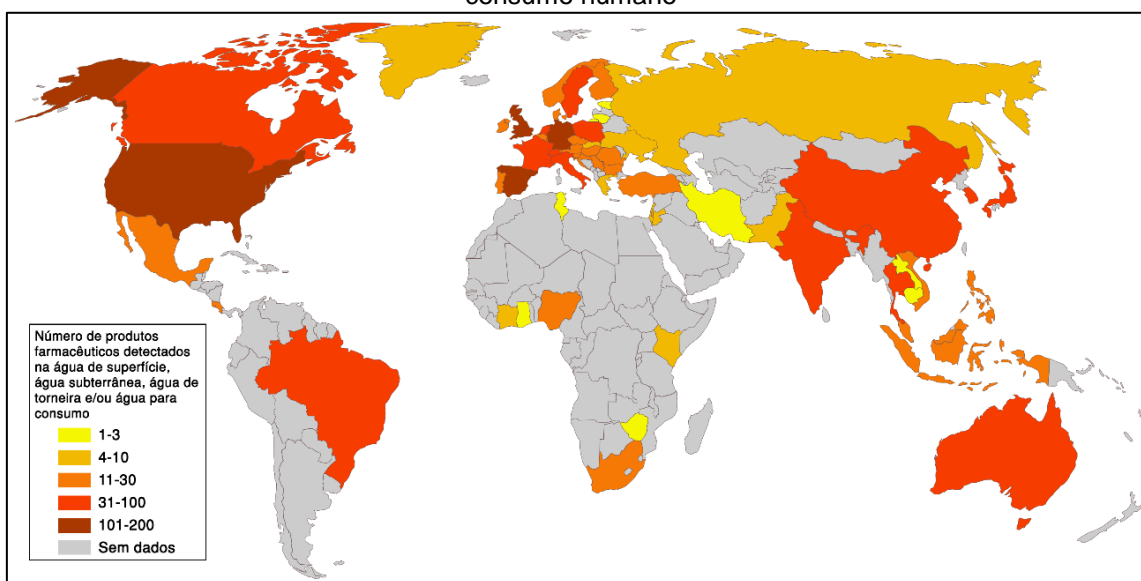
todo mundo, bem como nas grandes estações do Estado de São Paulo, não removem totalmente uma série de PCPs. A biodegradação desses contaminantes depende de vários fatores, incluindo, mas não se limitando as propriedades físico-químicas dos compostos, carregamento de carbono *in-situ*, condições redox, tempos de retenção hidráulica, tempos de retenção de lodo e composição da comunidade microbiana. Por consequência, espera-se que esses contaminantes cheguem ao ambiente aquático por meio dos efluentes das ETEs lançados em corpos d'água (OLIVEIRA, 2017; OECD, 2019).

FATA-KASSINOS e colaboradores (2010) editaram um compendio contemplando uma série de trabalhos que relatam a presença de fármacos em efluentes de estações de tratamento de águas residuárias e também em águas superficiais. Em São Paulo, estudos recentes realizados por OLIVEIRA (2017) e SOUZA (2017), também relataram a ocorrência de uma série de IFAs em águas superficiais.

A presença de produtos farmacêuticos em ecossistemas de água doce e terrestres pode resultar na incorporação de IFAs em organismos selvagens devido ao potencial de bioacumulação desses compostos (ARNOLD *et al.*, 2014). Seres humanos podem posteriormente ser expostos por meio da ingestão de água e alimentos devido à presença de resíduos farmacêuticos (OECD, 2019).

A ocorrência, distribuição e destino de fármacos e seus metabólitos em ambientes aquáticos é reconhecida como um assunto emergente na química ambiental, com trabalhos sendo publicados desde o final da década de 1990 (HEBERER, 2002). Porém, segundo AUS DER BEEK e colaboradores (2016), apesar dos mais de 150 artigos de revisão publicados sobre o tema, poucos apresentaram uma perspectiva global sobre esse tipo de avaliação; levando-os a realizar um levantamento para entender melhor a presença de fármacos em ambientes aquáticos em uma escala global (Figura 2).

Figura 2 – Número de fármacos detectados em água superficial, água subterrânea e água para consumo humano



Fonte: Traduzido de AUS DER BEEK *et al.* (2016)

O número de compostos detectados em diferentes localidades tem uma provável relação com o fato de serem raros os estudos sobre a ocorrência de fármacos em águas em alguns países em comparação com outros onde o incentivo à pesquisa é maior, como Estados Unidos e Espanha (SOUZA, 2017).

Ainda segundo o levantamento realizado por SOUZA (2017), esse tipo de pesquisa no Brasil se concentra nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, o que poderia ser justificado por serem regiões populosas, concentrarem grandes aglomerados urbanos e, principalmente, por apresentarem maiores recursos para pesquisa e abrigarem as principais universidades e infraestrutura analítica do país.

Desde a publicação realizada por STUMPF e colaboradores (1999), inúmeras pesquisas sobre o tema foram publicadas no Brasil, com destaque para a publicação de MACHADO e colaboradores (2016) que realizaram o primeiro levantamento nacional de fármacos e outros contaminantes emergentes em água para consumo humano e em mananciais de 22 estados brasileiros.

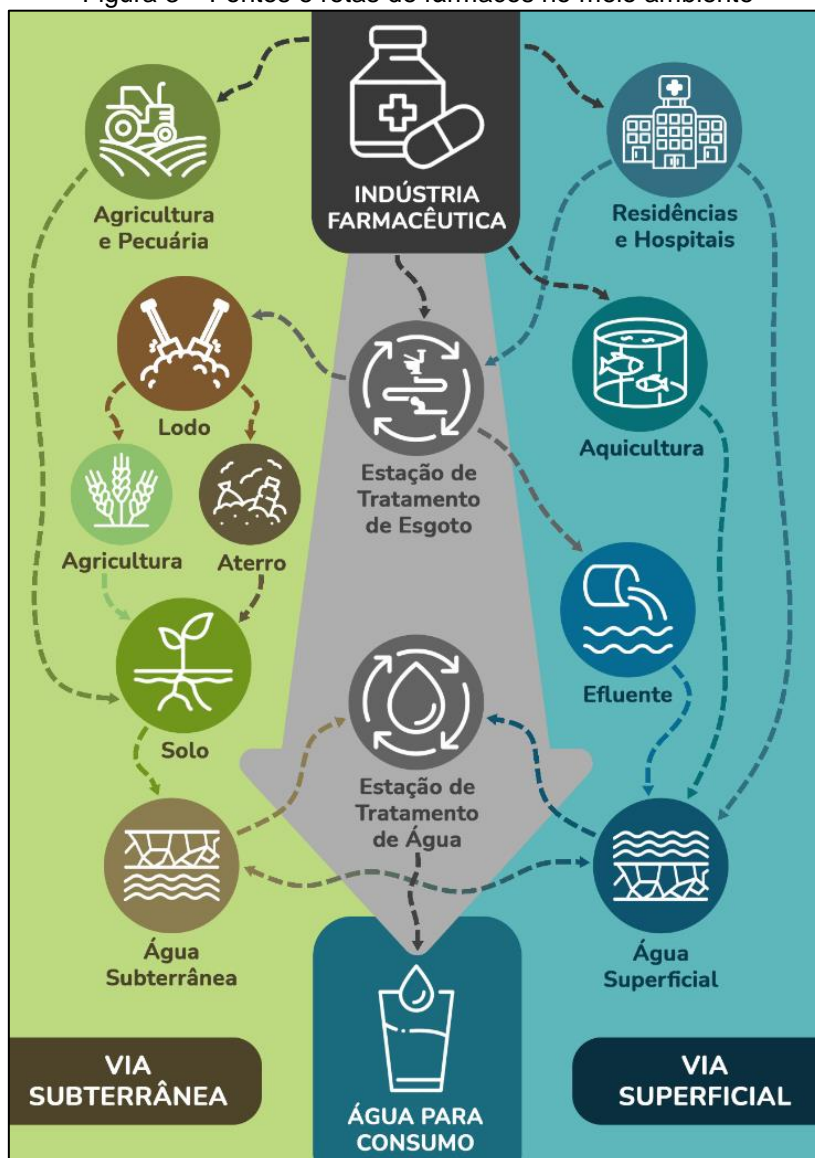
O gerenciamento da ocorrência desses compostos no ambiente é considerado um desafio devido ao fato dos IFAs serem desenvolvidos para interagir com sistemas biológicos e produzir respostas farmacológicas em doses baixas, fazendo com que as concentrações ambientais sejam motivo de preocupação. Eles são frequentemente projetados para passar facilmente por membranas biológicas e podem interagir com moléculas alvo em uma variedade de organismos. Quando organismos não-alvo são expostos no ambiente, podem ocorrer impactos prejudiciais não intencionais e desconhecidos. (MONTAGNER *et al.*, 2017; OECD, 2019).

Além disso, produtos farmacêuticos são desenvolvidos para serem estáveis, a fim de alcançar e interagir com as moléculas alvo, o que implica em uma cinética de degradação lenta, produzindo uma liberação contínua no ambiente de frações não degradadas e não absorvidas pelo organismo. Portanto, o desenho químico de um fármaco eficaz é contrário ao que é desejável para o meio ambiente (KHETAN e COLLINS, 2007; BERNHARDT *et al.*, 2017).

A concentração e impacto de fármacos no ambiente depende de uma combinação de variáveis, incluindo tipo, forma, frequência de uso, toxicidade, cinética de degradação, persistência e mobilidade dos compostos, fonte e tempo de poluição, tecnologia de tratamento de águas residuárias e esgotos (operação e eficiência de remoção), práticas agrícolas e veterinárias, sensibilidade e histórico de exposição do ambiente receptor e condições estocásticas do ambiente (OECD, 2019).

Como fontes de fármacos e seus metabólitos no ambiente aquático pode-se citar o processo industrial de produção, consumidores, hospitais, agricultura/aquicultura e, de forma mais direta e importante, os lançamentos de efluentes pelas estações de tratamento de esgoto (Figura 3) (OECD, 2019; OLIVEIRA, 2017; SOUZA, 2017).

Figura 3 – Fontes e rotas de fármacos no meio ambiente



Fonte: autor

Os estudos de avaliação quantitativa de risco indicam baixo risco à saúde humana associado com exposição a fármacos por meio da ingestão de água (WHO, 2012). Porém, por maior que seja o avanço no entendimento dos impactos ambientais dos fármacos, a maioria dos compostos ainda não foi avaliada quanto a toxicidade crônica e ocorrência ou destino no meio ambiente, o que torna difícil a generalização dos riscos associados. Além disso, embora os produtos farmacêuticos sejam rigorosamente regulamentados quanto à eficácia e segurança do paciente, os efeitos adversos que eles podem ter no ambiente natural ainda não foram suficientemente estudados (WEBER *et al.*, 2014).

A presença de produtos farmacêuticos no meio ambiente tem levantado preocupações dos consumidores, agências reguladoras, governos e distribuidores de água em relação aos riscos para saúde humana e ambiental. Certos produtos farmacêuticos provaram causar efeitos adversos aos ecossistemas, incluindo mortalidade, mudanças na fisiologia, comportamento e

reprodução em organismos teste. Antidepressivos, por exemplo, demonstraram alterar o comportamento dos peixes e certos produtos farmacêuticos considerados desruptores endócrinos também podem interferir na reprodução desses organismos (OECD, 2019). A Agência Ambiental Alemã (UBA) estima que 10% dos produtos farmacêuticos apresentam um potencial risco ambiental, sendo que os mais preocupantes são os hormônios, antibióticos, analgésicos, antidepressivos, produtos anticâncer e parasitocidas (KUSTER e ADLER, 2014).

Muitos países têm programas de monitoramento para medir as concentrações de certos produtos farmacêuticos nas águas superficiais a fim de determinar as medidas adequadas para o enfrentamento dos riscos frente a estas substâncias no futuro, como inclusão em monitoramentos sistemáticos e desenvolvimento de normas de qualidade ambiental (OECD, 2019).

3.4 Interferentes Endócrinos

Dentre os contaminantes emergentes, incluindo algumas classes de fármacos, estão compostos classificados quanto ao potencial de alterar certas funções naturais do sistema endócrino (GHISELLI e JARDIM, 2007; MONTAGNER *et al.*, 2017).

De acordo com o Programa Internacional de Segurança Química (2002), um interferente endócrino é uma substância ou uma mistura exógena que altera a função do sistema endócrino e conseqüentemente causa efeitos adversos em um organismo intacto, em seus descendentes ou em sub-populações.

De forma mais específica, CRISP e colaboradores (1998) definem essa classe de compostos como “agentes exógenos que interferem na síntese, secreção, transmissão, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais no corpo que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento”.

Os IEs podem apresentar comportamento estrogênico, regulando e sustentando o desenvolvimento sexual feminino e suas funções reprodutivas, ou comportamento androgênico, participando de processos responsáveis pelo desenvolvimento de características secundárias masculinas (GHISELLI e JARDIM, 2007).

Segundo MONTAGNER e colaboradores (2017), existe ainda uma classificação para os interferentes endócrinos quanto a sua origem e/ou ação: estrogênios naturais, estrogênios sintéticos e xenoestrogênios; sendo que os estrogênios sintéticos apresentam maior capacidade de interferir no sistema endócrino humano em comparação aos demais tipos de estrógenos, enquanto que os xenoestrogênios são menos potentes, porém mais prováveis de serem encontrados no ambiente.

Os interferentes endócrinos encontram-se distribuídos em vários compartimentos do meio ambiente, dadas as características físico-químicas e origem, tanto pontual quanto difusa, desses contaminantes (REIS FILHO *et al.*, 2007; BILA e DEZOTTI, 2007; GHISELLI e JARDIM, 2007; SILVA, 2009).

A incorporação dos IEs na biota, por meio de mecanismos de bioacumulação, levam à biomagnificação ao longo da cadeia trófica de forma que animais superiores e não aquáticos também podem estar expostos a esses compostos como já descrito por GOKSØYR (2006).

De acordo com CÉSPEDES e outros (2004), o hormônio endógeno 17 - estradiol (E2) e o fármaco contraceptivo 17 α -etinilestradiol (EE2) são bastante relevantes devido ao elevado potencial de ligação com os receptores de estrógeno α e β e capacidade de alterar funções hormonais da biota aquática em baixas concentrações (0,1 – 10 ng.L⁻¹).

Embora o aumento do número de pesquisas e publicações acerca da ocorrência de IEs em matrizes ambientais e seus efeitos, as primeiras evidências sobre seus efeitos na saúde humana e na biota datam das primeiras décadas do século XX com destaque para a publicação de um estudo sobre mimetização de hormônios endógenos realizado por WALKER e JANNEY (1930).

MARTINI (2018), em sua tese de doutorado, levantou breve histórico da ocorrência dos interferentes endócrinos no meio ambiente evidenciando a existência de pesquisas desde a década de 1930 relacionando diversas classes de compostos (pesticidas, inseticidas, estrógenos sintéticos, bifenilas policloradas, organometálicos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) com efeitos negativos à saúde humana e à biota.

A presença de produtos de degradação e metabólicos dos interferentes endócrinos também deve ser considerada, pois mesmo que esses compostos sejam excretados em sua forma conjugada, podem retornar a forma livre (na maioria das vezes mais ativa) dependendo das condições do meio ou do tipo de tratamento a que forem submetidos. Também deve-se investigar os efeitos sinérgicos das diferentes moléculas, uma vez que raramente um organismo é exposta a apenas um IE (SODRÉ *et al.*, 2007).

3.5 Glicocorticoides

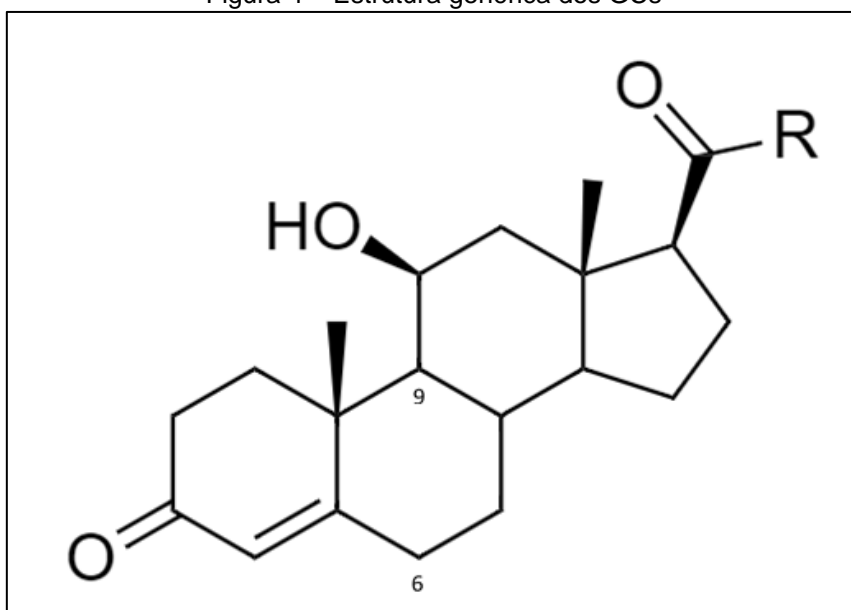
A ocorrência de um grupo de fármacos esteroidais em ambientes aquáticos, os glicocorticoides (GCs), tem chamado atenção de pesquisadores devido ao fato de serem parte do grupo de substâncias que funcionam como interferentes endócrinos e de que concentrações cerca de 10 vezes acima das concentrações encontradas para estrogênio e androgênio terem sido relatadas no ambiente (LIU *et al.*, 2012; RUNNALLS *et al.*, 2010; SHEN *et al.*, 2020).

Os glicocorticoides são altamente efetivos como anti-inflamatórios, imunossupressores e descongestionantes. Há décadas são usados em uma variedade de doenças e condições clínicas relacionadas a doenças autoimunes, reações alérgicas e câncer. Os fármacos representantes dos GC mais conhecidos são cortisona, hidrocortisona, beclometasona, betametasona, dexametasona, metilprednisolona, prednisolona e triancinolona, já o principal representante natural dos GCs é o cortisol (DAMIANI *et al.*, 2001; KUGATHAS *et al.*, 2012).

Mais recentemente, os glicocorticoides têm sido utilizados em escala mundial em tratamentos clínicos associados às infecções por SARS-CoV-2, o que também levantou preocupações a respeito dos possíveis impactos ambientais ao possível aumento do uso e, conseqüentemente, chegada aos ecossistemas aquáticos (ALEXAKI e HENNEICKE, 2020; TARAZONA *et al.*, 2021).

Os GCs apresentam uma estrutura química básica genérica (Figura 4) e são relativamente solúveis em água, com valores de logP de 1 a 3 (Tabela 1). Tal propriedade implica em certa facilidade de serem eliminados do corpo por meio do metabolismo e da excreção. As pressões de vapor e constantes de Henry muito baixas (Tabela 1) significam que eles não são voláteis no ambiente aquático.

Figura 4 – Estrutura genérica dos GCs



Fonte: autor

Na maioria dos corticosteroides sintéticos, muito semelhantes quimicamente aos naturais, o hidrogênio do carbono 6 e/ou 9 é substituído por flúor ou cloro. Essa substituição por halogênio aumenta a estabilidade desses compostos no corpo humano, evitando a administração frequente. Prevê-se, então, que os corticosteroides halogenados se degradem de forma relativamente lenta no ambiente e, portanto, podem ser encontrados no ambiente aquático (KUGATHA *et al.*, 2012).

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas de alguns GCs

Glicocorticoide	Fórmula Molecular	Massa Molar (g.mol ⁻¹)	LogP	Solubilidade em Água (g.mol ⁻¹ a 25°C)	Pressão de Valor (mmHg a 25°C)	Constante de Henry (atm.m ³ .mol ⁻¹ a 25°C)
Beclometasona	C ₂₂ H ₂₉ ClO ₅	408,9	2,12	49,39	6,19E-17	1,27E-08
Betametasona	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	392,5	1,93	75,14	2,81E-05	7,15E-08
Dexametasona	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	392,5	1,83	89	8,86E-14	7,15E-08
Fluticasona	C ₂₂ H ₂₇ F ₃ O ₄ S	444,5	3,7	27	2,79E-15	3,15E-08
Hidrocortisona	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	362,4	1,61	219,6	3,44E-15	5,77E-08
Prednisolona	C ₂₁ H ₂₆ O ₅	358,4	1,66	221,4	2,13E-15	2,17E-08

Fonte: Adaptado de KUGATHAS *et al.* (2012)

Glicocorticoides naturais, incluindo o cortisol e certos metabólitos estão envolvidos no metabolismo de regulação energética, funções imunes, respostas a estresse e comportamento em vertebrados (COUTINHO e CHAPMAN, 2011).

Alguns estudos relatam que GCs detectados em amostras ambientais podem causar efeitos adversos a organismos aquáticos, mesmo em concentrações abaixo de 100 ng.L⁻¹, consideradas relativamente baixas (KUGATHAS e SUMPTER, 2011; MACIKOVA *et al.*, 2014).

A exposição de *Danio rerio* a cortisol (145 ng.L⁻¹) e propionato de clobetasol (91 ng.L⁻¹) pode causar aumento da frequência cardíaca, diminuição das contrações musculares, eclosão acelerada e alterações na expressão genética (WILLI *et al.*, 2017) e exposição a prednisolona (100 ng.L⁻¹) pode levar a mudanças na morfologia, comportamento de natação e fisiologia (MCNEIL *et al.*, 2016). Segundo LORENZ e colaboradores (2009) e estudos realizados por LALONE e outros (2012) e MARGIOTTA-CASALUCI (2016), a exposição a dexametasona pode afetar o desenvolvimento, reprodução, crescimento e expressão de mRNA de anfíbios e peixes. WILLI e colaboradores (2019) descobriram recentemente que a exposição individual de *Danio rerio* a propionato de flucasona (1 µg.L⁻¹), triancinolona acedtonida (1 µg.L⁻¹ e propionato de clobetasol (91 ng.L⁻¹) resultou em efeitos fisiológicos e transcricionais e que a co-exposição aos três GCs (89-110 ng.L⁻¹) mostrou atividade aditiva, levando ao aumento da frequência cardíaca e alterações nas transcrições de mais genes.

Além disso, alguns GCs que não foram considerados em investigações anteriores também podem afetar organismos aquáticos. Levantamento bibliográfico realizado por SHEN e colaboradores (2020) apontou que o metabólito natural desoxicorticosterona exibe atividade mineralocorticoide e possui de um terço a um décimo da potência da progesterona e que a presença de átomos de halogênio (Cl, F) em alguns GCs sintéticos lhes confere uma atividade profundamente maior do que seus correspondentes naturais e os torna

menos suscetíveis à degradação nos processos de tratamento de esgoto e em matrizes ambientais. Portanto, investigações abrangendo um maior número de moléculas de GCs ajudariam a identificar importantes contribuintes para os riscos que representam aos ambientes aquáticos.

A identificação e quantificação das concentrações de diferentes grupos de fármacos no ambiente aquático é necessária para avaliar o risco que esses compostos representam para os organismos aquáticos e para a saúde humana (KUGATHA *et al.*, 2012). Apesar da literatura científica apresentar estudos sobre a ocorrência de GCs, naturais e sintéticos, em águas superficiais e efluentes, as publicações se limitam a investigações em menos de 10 países, com número maior de pesquisas apenas na Holanda, Alemanha e China (Tabela 02).

Existe um avanço no número de pesquisas envolvendo a presença de contaminantes emergentes e fármacos em ambientes aquáticos no Brasil, porém até o momento não há registro de publicações contemplando a ocorrência de glicocorticoides em matrizes ambientais.

Tabela 2 – Publicações sobre ocorrência de GCs em ambientes aquáticos

Autor	Ano	Local de Estudo	Matriz	Técnica
Chang e colaboradores	2007	China	Efluente e água superficial	Cromatografia
Van der Linden e colaboradores	2008	Holanda	Efluente e água superficial	Bioensaio
Schrink e colaboradores	2010	Holanda	Efluente	Cromatografia
Stavreva e colaboradores	2012	Estados Unidos	Água superficial	Bioensaio
Schrink e colaboradores	2013	Holanda	Água superficial	Bioensaio
Macikova e colaboradores	2014	República Checa e Suíça	Efluente e água superficial	Bioensaio
Isob e colaboradores	2015	Japão	Efluente	Cromatografia
Tousova e colaboradores	2017	Alemanha, República Checa, Eslováquia, Hungria e Suíça	Água superficial	Cromatografia e Bioensaio
Houtman e colaboradores	2018	Holanda	Efluente	Bioensaio
Weizel e colaboradores	2018	Alemanha	Efluente e água superficial	Cromatografia
Daniels e colaboradores	2018	Alemanha	Efluente e água superficial	Bioensaio
Jia e colaboradores	2019	China	Água Superficial	Cromatografia e Bioensaio
Alygizakis e colaboradores	2019	Alemanha	Efluente	Bioensaio
Shen e colaboradores	2020	China	Água superficial	Cromatografia

Fonte: autor

3.6 Bioensaios

A bioanalítica tornou-se um ramo das ciências ambientais em rápido desenvolvimento e tem sido usada com sucesso para monitorar e avaliar a qualidade do meio ambiente. No momento, uma ampla gama de ferramentas é utilizada em estudos bioanalíticos, sendo os bioensaios uma delas (WIECZERZAK, 2016).

Bioensaios são procedimentos experimentais conduzidos para estimar os efeitos biológicos produzidos por uma substância ou mistura de substâncias sobre organismos ou ecossistemas. Os bioensaios também podem ser usados para determinar a concentração de uma constituição particular de uma mistura que pode causar efeitos nocivos. Podem ser classificados em *in vivo*, quando realizados em organismos vivos, ou *in vitro*, quando realizados em células, proteínas ou enzimas (BOSCH-OREA *et al.*, 2017).

Os bioensaios *in vitro* são considerados bons indicadores para detectar atividade biológica de compostos porque são de fácil aplicação, podem ser miniaturizados e permitem avaliar um maior número de amostras uma vez que suas respostas são determinadas em prazo relativamente curto. Além disso, não envolvem questões bioéticas de uso de animais para fins experimentais. Esses ensaios podem ser selecionados para avaliar a toxicidade de um composto específico que se queira investigar conforme as prováveis fontes de contaminação que possam atingir os ambientes de interesse (SOTO *et al.*, 2006; ESCHER e LEUSCH, 2012; LOPES, 2016).

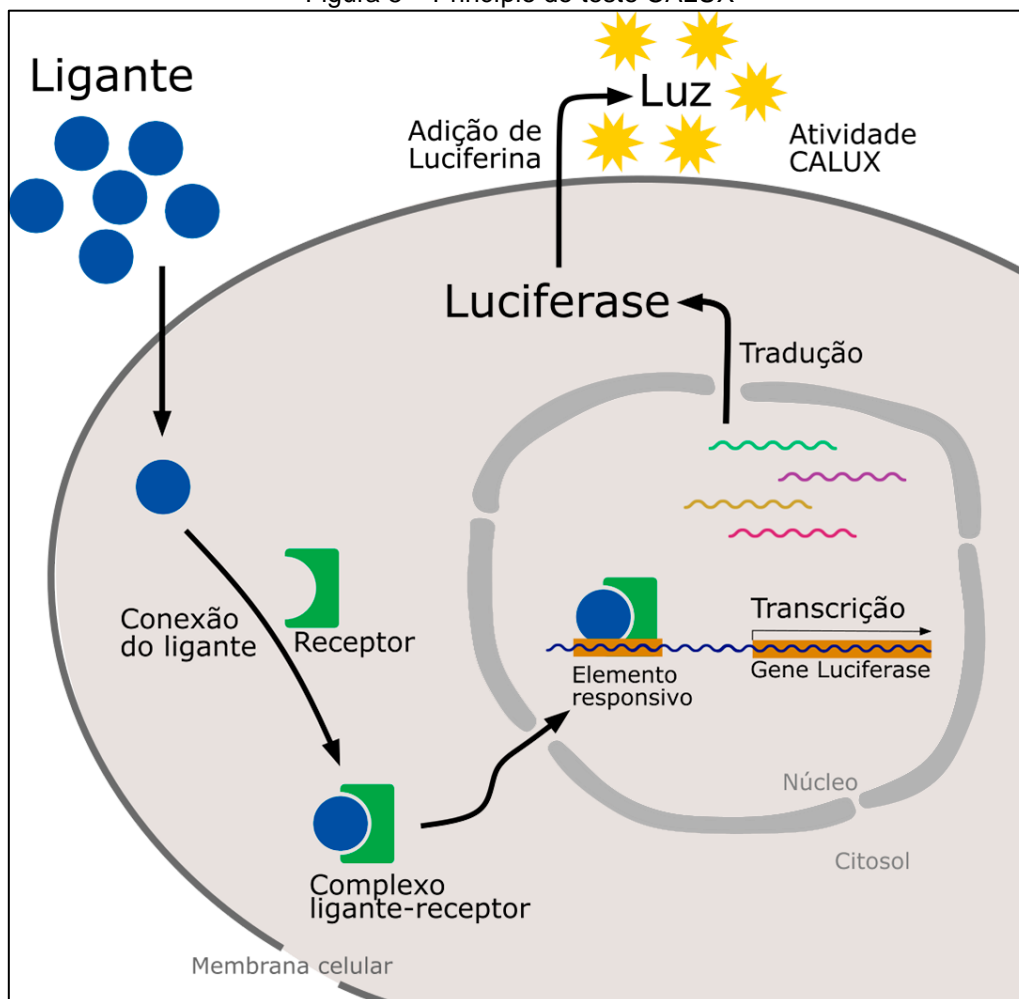
Trata-se de ensaios capazes de selecionar os compostos que, por afinidade, tenham ligação com os receptores das células, permitindo a seleção de uma série de compostos prioritários que agem especificamente nos receptores provocando resposta aguda, porém com a desvantagem de não determinar os efeitos biológicos subsequentes (LOPES, 2016; CLODE, 2006).

Os bioensaios possibilitam a rápida avaliação de qualidade das águas impactadas por efluentes e, em combinação com análises químicas, são valiosos para varredura e identificação de compostos que afetam a biota e para a avaliação das ligações causais da presença de substâncias no meio ambiente, quantificando a atividade total em amostras ambientais.

3.6.1 Atividade Glicocorticogênica (AG) e GR-CALUX

O bioensaio *in vitro* GR-CALUX (*Glucocorticoid Receptor – Chemical Activated Luciferase Gene Expression*) é baseado em células humanas de osteossarcoma osteoblástico (U2-OS) transfectadas com gene luciferase sob controle transcricional de elementos de resposta para receptores hGR α (Figura 5).

Figura 5 – Princípio do teste CALUX



Fonte: Traduzido de *BioDetection Systems* (sem data)

Nesse ensaio mede-se, portanto, a atividade glicocorticogênica, e isto significa que os resultados estão relacionados ao conjunto de substâncias presente nas amostras que ativam o glicoreceptor das células teste. A expressão dos resultados é baseada em uma curva dose-resposta sigmoideal construída a partir de dexametasona (composto de referência) e reportada em nanograma equivalente de dexametasona por litro ($\text{ng eq. DEX. L}^{-1}$). As linhagens de células GR-CALUX são fornecidas pela empresa *BioDetection Systems*, sediada em Amsterdã na Holanda.

Para efeito de comparação, estudos foram realizados para determinar os potenciais tóxicos de diferentes glicocorticoides em relação a dexametasona (Tabela 3). Dessa forma, um resultado de $1,00 \text{ ng eq. DEX. L}^{-1}$ pode significar a presença de cerca de 7 ng.L^{-1} de prednisolona, por exemplo.

Tabela 3 – Potenciais tóxicos de diferentes GCs

Glicocorticoide	Potencial Relativo	Referência
Dexametasona	1,00	HOUTMAN <i>et al.</i> , 2009 SCHRIKS <i>et al.</i> , 2010 MACIKOVA <i>et al.</i> , 2014
Betametasona	0,59	MACIKOVA <i>et al.</i> , 2014
Budesonida	6,1	MACIKOVA <i>et al.</i> , 2014
Cortisol	0,08 0,07 0,036	HOUTMAN <i>et al.</i> , 2009 SCHRIKS <i>et al.</i> , 2010 MACIKOVA <i>et al.</i> , 2014
Cortisona	0,00	HOUTMAN <i>et al.</i> , 2009 SCHRIKS <i>et al.</i> , 2010
Flumetasona	4,00	MACIKOVA <i>et al.</i> , 2014
Prednisolona	0,09 0,2 0,13	HOUTMAN <i>et al.</i> , 2009 SCHRIKS <i>et al.</i> , 2010 MACIKOVA <i>et al.</i> , 2014
Prednisona	0,00	SCHRIKS <i>et al.</i> , 2010
6 α -metilprednisolona	0,4 0,54	SCHRIKS <i>et al.</i> , 2010 MACIKOVA <i>et al.</i> , 2014
Triancinolona acetona	2,3 1,12	SCHRIKS <i>et al.</i> , 2010 MACIKOVA <i>et al.</i> , 2014

Fonte: autor

Considerando a grande variedade de moléculas do grupo dos fármacos glicocorticoides, o que dificulta o monitoramento de todos os compostos alvo de forma individualizada por meio de técnicas cromatográficas e também os possíveis efeitos das misturas dos GCs em ambientes aquáticos, o uso de bioensaios, como GR-CALUX, é uma importante ferramenta de monitoramento da ocorrência dessa classe de poluentes e de investigação de potenciais impactos a ela associados (THRUPP *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2016).

Ainda não existem valores orientadores oficiais para glicocorticoides ou atividade glicocorticogênica em matrizes ambientais, porém estudo realizado por BRAND e colaboradores (2013) sugere, a partir de derivações com base em valores de ingestão diária aceitável (IDA), 21 ng eq. DEX. L⁻¹ como valor máximo para investigações em água para consumo humano.

3.6.2 Atividade Estrogênica (AE) e BLYES

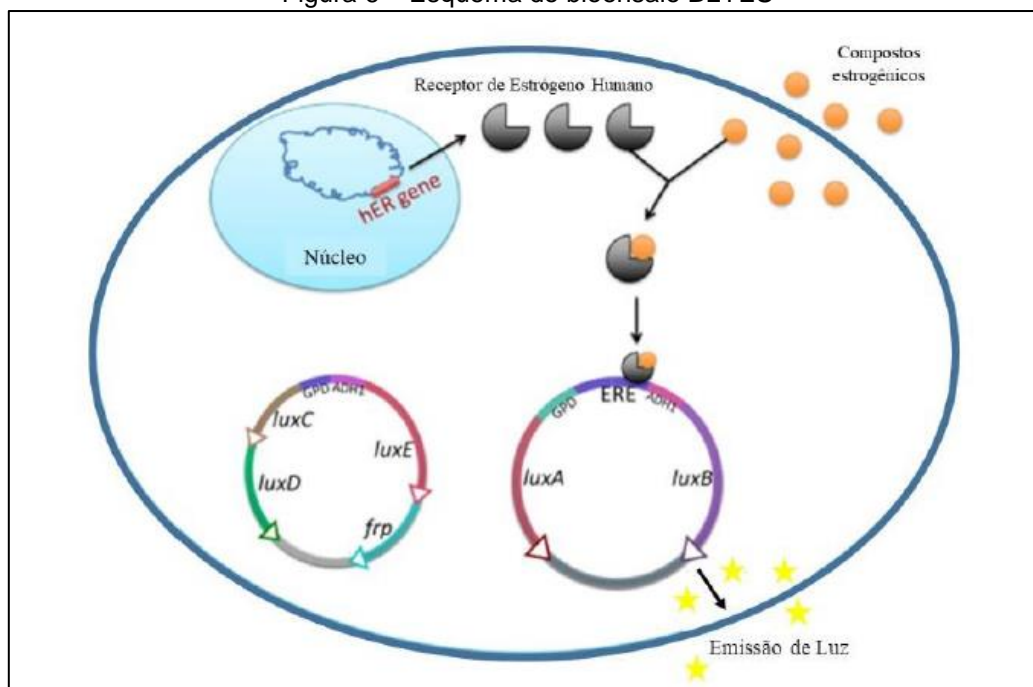
Apesar da ocorrência de compostos estrogênicos já ter sido observada e registrada em corpos d'água ao redor do mundo e do fato de que a presença dos interferentes endócrinos ser reconhecida como um desafio para a integridade da biota aquática, ainda não existem valores legislados para a presença de atividade estrogênica em águas naturais. No momento, a Europa discute o estabelecimento de critérios legislativos para os interferentes endócrinos (BERGAMASCO, 2011; CETESB, 2020).

De acordo com RAIMUNDO (2011), o bioensaio YES (*Yeast Strogen Screen*), baseado nas interações antígeno – anticorpo, é amplamente utilizado na avaliação da atividade estrogênica em amostras ambientais. Já o bioensaio *in vitro* BLYES (*Bioluminescent Yeast Estrogen Assay*) é um aprimoramento tecnológico deste teste colorimétrico e foi desenvolvido a partir do mesmo mecanismo de receptor e transmissor de detecção, mas com a vantagem da bioluminescência baseada na ativação de genes bacterianos de *Photorhabdus luminescens* que, ativados, produzem o substrato luciferina e a enzima luciferase. O fato de não requerer adição de substrato representa menor tempo para obtenção dos resultados, menor limitação de número de amostras, menos manuseio de amostra e redução de custos (LOPES, 2016).

A emissão de luz na faixa do visível, gerada a partir do processo de bioluminescência, é detectada e quantificada por meio de um luminômetro (ELDRIDGE *et al.*, 2015; SANSEVERINO *et al.*, 2005). Trata-se de um bioensaio de estrogenicidade que tem sido aplicado com reprodutibilidade e sensibilidade em diferentes tipos de amostra (ELDRIDGE *et al.*, 2015; RUAN *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015).

Em resumo, o bioensaio BLYES faz uso de cepa de *Sacharomyces cerevisiae* que contém receptor de estrogênio, uma sequência de DNA humano (hER- α) e um plasmídeo de base com elemento de resposta ao estrogênio (ERE)-lacZ que, quando ativado, reporta a ligação por sinal de bioluminescência (LOPES, 2016) (Figura 6).

Figura 6 – Esquema do bioensaio BLYES



Fonte: MARTINI (2018)

Nesse ensaio mede-se a atividade estrogênica, de forma que os resultados estão relacionados ao conjunto de substâncias presentes nas amostras que ativem o receptor hER- α das células teste. A expressão dos resultados é reportada em nanograma equivalente de estradiol por litro (ng eq. E2.L⁻¹).

3.7 Indicadores de qualidade das águas

O diagnóstico ou monitoramento da qualidade dos recursos hídricos é realizado por meio da avaliação de resultados de análises de parâmetros físico-químicos, biológicos e/ou toxicológicos estabelecidos, ou não, em legislações ambientais vigentes.

Segundo GASTALDHI e MENDONÇA (2011), os parâmetros de qualidade da água mais utilizados para a caracterização de corpos d'água são: temperatura, cor, odor, sólidos totais, turbidez, condutividade, pH, oxigênio dissolvido, dureza, clorofila, nitrogênio, fósforo, fitoplâncton/cianobactérias, demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO).

O Índice de Qualidade das Águas (IQA) criado em 1970 nos Estados Unidos pela *National Sanitation Foundation* começou a ser usado na década de 1970 pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) e hoje é o principal índice de qualidade de água utilizado no país.

O IQA incorpora nove variáveis consideradas relevantes para a avaliação da qualidade das águas, tendo como determinante principal a sua utilização para abastecimento público após tratamento (CETESB, 2020). Os nove parâmetros avaliados são: coliformes fecais ou *E.Coli*, pH, demanda bioquímica de oxigênio (DBO), nitrogênio total, fósforo total, temperatura, turbidez, sólidos totais (ST) e oxigênio dissolvido (OD).

Cada parâmetro de qualidade possui um significado ambiental e sanitário e, além das variáveis constantes no índice de qualidade das águas outros parâmetros também podem ser utilizados para mensurar carga orgânica e avaliar a presença de esgotos domésticos em corpos d'água como o carbono orgânico total.

3.7.1 Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)

A demanda bioquímica de oxigênio é um dos parâmetros mais utilizados no que se refere ao tratamento de esgotos. Trata-se da quantidade de oxigênio necessária para oxidar a matéria orgânica por decomposição microbiana aeróbia

para uma forma inorgânica estável, isto é, mede a quantidade de matéria orgânica oxidável por ação microbiológica (CETESB, 2020; NETTO *et al.*, 1977).

A DBO é utilizada para indicar o grau de poluição de um esgoto, ou seja, um índice de concentração de matéria orgânica por uma unidade de volume de água residuárias (MELO, 2007).

A DBO é normalmente considerada como a quantidade de oxigênio consumido durante um determinado período de tempo, numa temperatura de incubação específica. Um período de tempo de 5 dias numa temperatura de incubação de 20°C é frequentemente usado e referido como DBO_{5,20}. Porém é importante ressaltar que a DBO_{5,20} não representa a demanda total de oxigênio, pois a demanda bioquímica total ocorre em período muito superior na maioria das vezes (SILVA, 2004).

Os maiores aumentos em termos de DBO, num corpo d'água, são provocados por despejos de origem predominantemente orgânica. A presença de um alto teor de matéria orgânica pode induzir ao completo esgotamento do oxigênio na água, provocando o desaparecimento de peixes e outras formas de vida aquática. Um elevado valor da DBO pode indicar um incremento da microflora presente e interferir no equilíbrio da vida aquática, além de produzir sabores e odores desagradáveis e, ainda, pode obstruir os filtros de areia utilizados nas estações de tratamento de água (CETESB, 2020)

3.7.2 Carbono Orgânico Total (COT)

O carbono orgânico nas águas brutas e nas águas residuais está relacionado aos átomos de carbono presente em vários compostos orgânicos, sendo que alguns desses compostos podem ser oxidados posteriormente por meio de processos biológicos ou químicos. Trata-se, então, de uma expressão mais conveniente e direta do conteúdo orgânico total do que a DBO, mas não fornece o mesmo tipo de informação (APHA, 2017).

O carbono orgânico em água doce origina-se da matéria viva e também de efluentes e resíduos. Sua importância ambiental deve-se ao fato de servir como fonte de energia para bactérias e algas, além de complexar metais. O carbono orgânico total na água também é um indicador útil do grau de poluição do corpo hídrico (CETESB, 2020)

A quantidade de COT em águas varia entre 0,1 e 25 mg.L⁻¹ em água para consumo humano e alcança valores maiores que 100 mg.L⁻¹ em águas residuais. Embora não seja um substituto direto para o teste de DBO, vários estudos demonstraram que correlações podem ser desenvolvidas e que o COT pode ser aceitável como parâmetro regulatório (APHA, 2017).

3.7.3 *Escherichia Coli (E.Coli)*

A determinação da concentração de coliformes assume muita importância por constituir não somente um parâmetro indicador da possibilidade de existência de microrganismos entéricos patogênicos, mas também da presença de qualquer outro componente normal de esgotos de origem doméstica uma vez que esse grupo de microrganismos está presente nas fezes humanas (BRANCO e ROCHA, 1977; CETESB, 2020).

E. Coli é a principal bactéria do subgrupo dos coliformes termotolerantes, sendo de origem exclusivamente fecal e está presente em número elevado nas fezes humanas e de animais de sangue quente, sendo raramente detectada na ausência de poluição fecal. É considerada o indicador mais adequado de contaminação fecal em águas doces (CETESB, 2020).

3.7.4 Fósforo Total

O fósforo é um nutriente fundamental para os organismos vivos e, na água, pode se apresentar tanto na forma dissolvida como agregado em materiais particulados (CETESB, 2020; VON SPERLING, 2005).

O fósforo aparece em águas naturais devido, principalmente, às descargas de esgotos sanitários. A matéria orgânica fecal e os detergentes em pó empregados em larga escala domesticamente constituem a principal fonte. Alguns efluentes industriais, como os de indústrias de fertilizantes, pesticidas, químicas em geral, conservas alimentícias, abatedouros, frigoríficos e laticínios, apresentam fósforo em quantidades excessivas. As águas drenadas em áreas agrícolas e urbanas também podem provocar a presença excessiva de fósforo em águas naturais (CETESB, 2020).

Assim como o nitrogênio, o fósforo constitui-se em um dos principais nutrientes para os processos biológicos. Nos casos em que é um nutriente limitante, a descarga de águas residuais brutas ou tratadas, drenagem agrícola ou certos resíduos industriais em corpos d'água pode estimular o crescimento de microrganismos e macroorganismos aquáticos fotossintéticos em quantidades incômodas, conduzindo a processos de eutrofização das águas naturais (APHA, 2017; CETESB, 2020; VON SPERLING, 2005).

3.7.5 Nitrogênio

Em águas e efluentes, as formas de nitrogênio de maior interesse são os íons nitrato, nitrito, nitrogênio amoniacal e nitrogênio orgânico. Todas essas

formas de nitrogênio, assim como o gás nitrogênio (N_2), são bioquimicamente convertíveis entre si e interessantes do ponto de vista ambiental e sanitário por vários motivos (APHA, 2017).

O nitrogênio é considerado um dos elementos mais importantes no metabolismo dos ecossistemas aquáticos e sua concentração pode limitar a produção primária, aumentar a proliferação de microrganismos e apresentar potencial tóxico aos organismos aquáticos (VON SPERLING, 2005).

O nitrato, presente na maioria das águas superficiais, é proveniente majoritariamente de atividades antrópicas, de forma que sua concentração pode refletir a condição de saneamento local. O nitrogênio amoniacal é encontrado naturalmente nas águas superficiais, como resultante de processos de decomposição da matéria orgânica, porém altos níveis desse indicador estão relacionados à poluição por esgotos domésticos ou industriais (BRIGANTE e ESPÍNDOLA, 2009; MACÊDO, 2001).

Os esgotos sanitários constituem, em geral, a principal fonte de lançamento de nitrogênio orgânico e nitrogênio amoniacal nas. Alguns efluentes industriais também concorrem para as descargas de nitrogênio orgânico e amoniacal nas águas, como algumas indústrias químicas, petroquímicas, siderúrgicas, farmacêuticas, conservas alimentícias, matadouros, frigoríficos e curtumes (CETESB, 2020).

A atmosfera é outra fonte importante de nitrogênio devido a diversos mecanismos como a biofixação desempenhada por bactérias e algas presentes nos corpos hídricos, que incorporam o nitrogênio atmosférico, contribuindo para a presença de nitrogênio orgânico nas águas; a fixação química, reação que depende da presença de luz, também acarreta a presença de amônia e nitratos nas águas, pois a chuva transporta tais substâncias, bem como as partículas contendo nitrogênio orgânico para os corpos hídricos (CETESB, 2020).

Nas áreas agrícolas, o escoamento das águas pluviais pelos solos fertilizados também contribui para a presença de diversas formas de nitrogênio. Já em áreas urbanas, a drenagem das águas pluviais, associada às deficiências do sistema de limpeza pública, constitui fonte difusa de difícil caracterização (CETESB, 2020).

Pode-se associar as etapas de degradação da poluição orgânica por meio da relação entre as formas de nitrogênio. Nas zonas de autodepuração natural em rios, distinguem-se as presenças de nitrogênio orgânico na zona de degradação, amoniacal na zona de decomposição ativa, nitrito na zona de recuperação e nitrato na zona de águas limpas. Ou seja, se for coletada uma amostra de água de um rio poluído e as análises demonstrarem predominância das formas reduzidas significa que o foco de poluição se encontra próximo; se prevalecerem o nitrito e o nitrato, denota que as descargas de esgotos se

encontram distantes. O nitrogênio orgânico é determinado pelo método *Kjeldahl* (NKT), cujo resultado indica as frações totais de nitrogênio orgânico e de nitrogênio amoniacal (CETESB, 2020).

Os compostos de nitrogênio são nutrientes para processos biológicos e são caracterizados como macronutrientes, pois, depois do carbono, o nitrogênio é o elemento exigido em maior quantidade pelas células vivas. Quando descarregados nas águas naturais, conjuntamente com o fósforo e outros nutrientes presentes nos despejos, provocam o enriquecimento do meio, tornando-o eutrofizado (CETESB, 2020; VON SPERLING, 2005).

Pela legislação federal em vigor, o nitrogênio amoniacal é padrão de classificação das águas naturais e padrão de emissão de esgotos. A amônia é um tóxico bastante restritivo à vida dos peixes, sendo que muitas espécies não suportam concentrações acima de 5 mg.L^{-1} . Além disso, a amônia provoca consumo de oxigênio dissolvido das águas naturais ao ser oxidada biologicamente, a chamada DBO de segundo estágio. Por estes motivos, a concentração de nitrogênio amoniacal é um importante parâmetro de classificação das águas naturais (CETESB, 2020).

3.7.6 Oxigênio Dissolvido (OD)

Os níveis de oxigênio dissolvido em águas naturais e residuais dependem das atividades físicas, químicas e bioquímicas de um corpo d'água e devido a sua importância a determinação das concentrações de OD torna-se chave para a investigação de poluição dos corpos d'água.

Uma adequada provisão de oxigênio dissolvido é essencial para a manutenção de processos de autodepuração em sistemas aquáticos naturais e em estações de tratamento de esgotos. Por meio da medição da concentração de oxigênio dissolvido, os efeitos de resíduos oxidáveis sobre águas receptoras e a eficiência do tratamento dos esgotos, durante a oxidação bioquímica, podem ser avaliados. Os níveis de oxigênio dissolvido também indicam a capacidade de um corpo d'água natural em manter a vida aquática (CETESB, 2020).

De acordo com ESTEVES (1998), o oxigênio dissolvido encontra-se entre os parâmetros limnológicos que apresentam as maiores variações diárias, pois é um gás que está diretamente envolvido com o processo de fotossíntese e respiração e/ou decomposição que, por sua vez, estão inteiramente relacionados com o fotoperíodo, a intensidade luminosa e a temperatura.

Num corpo d'água eutrofizado, o crescimento excessivo de algas pode "mascarar" a avaliação do grau de poluição de uma água, quando se toma por base apenas a concentração de oxigênio dissolvido. Sob este aspecto, águas poluídas são aquelas que apresentam baixa concentração de oxigênio dissolvido

(devido ao seu consumo na decomposição de compostos orgânicos), enquanto que as águas limpas apresentam concentrações de oxigênio dissolvido elevadas, chegando até a um pouco abaixo da concentração de saturação (CETESB, 2020).

3.7.7 pH

O valor de pH, um parâmetro importante em muitos estudos no campo do saneamento ambiental, influi no equilíbrio químicos entre formas livres e ionizadas de diversos compostos químicos, além de contribuir para um maior ou menor grau de solubilidade de diversas substâncias e também definir potencial de toxicidade de vários elementos (APHA, 2017; BRASIL, 2006; CETESB, 2020).

As alterações de pH podem ter origem natural (dissolução de rochas, fotossíntese) ou antropogênica (despejos domésticos e industriais) e influenciam os ecossistemas aquáticos naturais diretamente devido a seus efeitos sobre a fisiologia das diversas espécies (CETESB, 2020).

O pH pode ser considerado como um dos parâmetros ambientais mais relevantes e utilizadas em químicas das águas, porém trata-se de uma variável de difícil interpretação. Tal complexidade é resultante dos inúmeros fatores que podem influenciá-lo, podendo estar relacionado a fontes de poluição difusa (MESSIAS, 2008).

3.7.8 Sólidos Totais (ST)

Em saneamento, sólidos nas águas correspondem a toda matéria que permanece como resíduo, após evaporação, secagem ou calcinação da amostra a uma temperatura pré-estabelecida durante um tempo fixado. Em linhas gerais, as operações de secagem, calcinação e filtração são as que definem as diversas frações de sólidos presentes na água (sólidos totais, em suspensão, dissolvidos, fixos e voláteis). Os chamados sólidos totais, são a soma dessas diversas frações (CETESB, 2020).

Para o recurso hídrico, os sólidos podem causar danos aos peixes e à vida aquática. Eles podem sedimentar no leito dos rios destruindo organismos que fornecem alimentos ou, também, danificar os leitos de desova de peixes. Os sólidos podem reter bactérias e resíduos orgânicos no fundo dos rios, promovendo decomposição anaeróbia, além de poder interferir na transparência e nos ciclos biodinâmicos (CETESB, 2020; TELLES *et al.*, 2013).

Elevados valores de sólidos totais podem estar relacionados ao lançamento de esgotos domésticos e/ou industriais brutos e tratados, mas também podem estar associados a poluição difusa e processos erosivos.

3.7.9 Temperatura

A temperatura influencia uma série de processos biológicos, reações químicas e bioquímicas que ocorrem no ambiente aquático de forma que é um parâmetro importante para avaliações ambientais (MACÊDO, 2006).

Variações de temperatura são parte do regime climático normal e corpos de água naturais apresentam variações sazonais e diurnas, bem como estratificação vertical. A temperatura superficial é influenciada por fatores tais como latitude, altitude, estação do ano, período do dia, taxa de fluxo e profundidade. A elevação da temperatura em um corpo d'água geralmente é provocada por despejos industriais (indústrias canavieiras, por exemplo) e usinas termoelétricas (CETESB, 2020).

3.7.10 Turbidez

A turbidez de uma amostra de água é o grau de atenuação, por absorção ou espalhamento, da intensidade que um feixe de luz sofre ao atravessá-la devido à presença de partículas sólidas em suspensão que diminuem a transparência e a, por consequência, a penetração de luz no ambiente. As partículas sólidas causadoras da turbidez podem ser de origem natural, associadas à rochas, argila e silte, algas e outros microrganismos, ou de origem antrópica, podendo estar relacionadas a compostos tóxicos e organismos patogênicos (CETESB, 2020; VON SPERLING, 2005).

A erosão das margens dos rios em épocas chuvosas, que é intensificada pelo mau uso do solo, é um exemplo de fenômeno que resulta em aumento da turbidez das águas. Este exemplo mostra também o caráter sistêmico da poluição, ocorrendo inter-relações ou transferência de problemas de um ambiente (água, ar ou solo) para outro (CETESB, 2020; VANZELA, 2010).

Os esgotos domésticos e diversos efluentes industriais também provocam elevações na turbidez das águas (CETESB, 2020).

4 METODOLOGIA

O presente estudo foi realizado em parceria com a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. As análises de atividade glicocorticogênica e atividade

estrogênica foram conduzidas no Setor de Análises Toxicológicas da CETESB e os ensaios físico-químicos e microbiológicos complementares realizados pelos laboratórios químicos do Departamento de Análises Ambientais e Departamento de Laboratórios Descentralizados da mesma instituição.

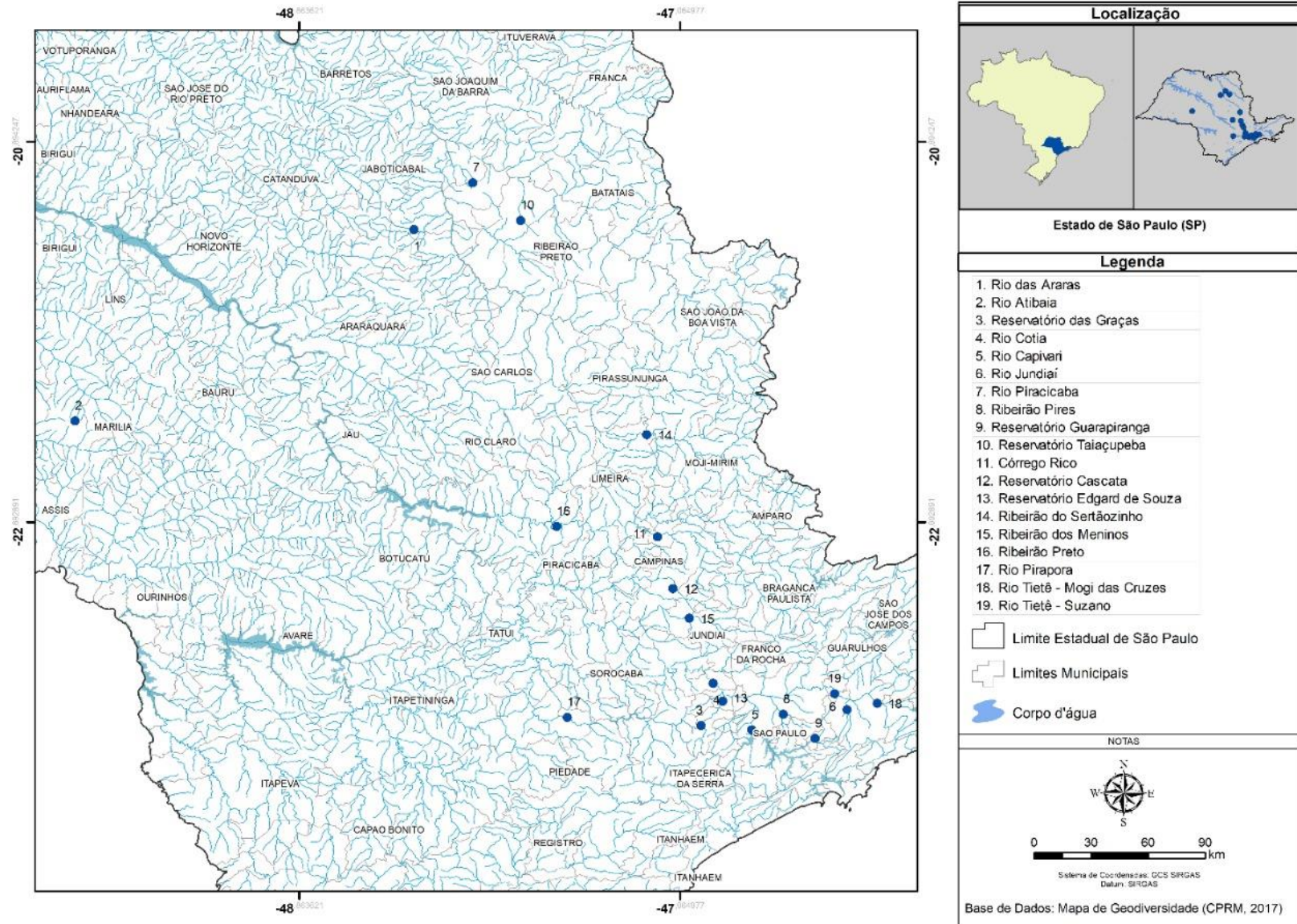
4.1 Locais de Amostragem

A seleção dos pontos avaliados teve como base o histórico de resultados para atividade estrogênica (AE) de 2016 e 2017 obtidos do monitoramento da CETESB, uma vez que a rota de chegada desses compostos aos ambientes aquáticos é bastante similar a rota dos glicocorticoides. Foi levado em consideração, também, o interesse em se avaliar locais utilizados para captação de água com finalidade de abastecimento público após tratamento (CETESB, 2016;2017; MARTINI, 2018).

Foram escolhidos 19 pontos de amostragem para serem avaliados ao longo de 2018, 2019 e 2020. As informações sobre localização e detalhes dos pontos de coleta constam na Figura 5 e na Tabela 6.

Os meses de coleta para cada ponto estudado constam no APÊNDICE A.

Figura 7 – Mapa de localização dos pontos de amostragem



Fonte: autor

Tabela 4 – Informações dos locais de amostragem

Ponto	Código	Descrição	Coordenadas Geográficas
Rio das Araras	ARAS02900	Ponte de madeira sobre Rio Araras, junto à foz	22° 16 ' 46 " S 47° 13 ' 23 " W
Rio Atibaia	ATIB02800	Na captação do município de Sumaré, perto do Mini Pantanal de Paulínia	22° 45 ' 41 " S 47° 10 ' 24 " W
Reservatório das Graças	COGR00900	Na barragem, junto à captação do Alto Cotia	23° 39 ' 12 " S 46° 58 ' 03 " W
Rio Cotia	COTI03900	No canal de captação de águas para a ETA do Baixo Cotia	23° 32 ' 17 " S 46° 51 ' 56 " W
Rio Capivari	CPIV02130	Na captação de Campinas-ETA Capivari na Rodovia dos Bandeirantes	23° 00 ' 22 " S 47° 05 ' 60 " W
Rio Jundiá	JUNA03190	Ponte de acesso à Akzo Nobel, em Itupeva.	23° 08 ' 49 " S 47° 01 ' 22 " W
Rio Piracicaba	PCAB0220	Margem esquerda, 2,5 Km a jusante da foz do Rib. Piracicaba Mirim, na captação de Piracicaba	22° 42 ' 44 " S 47° 38 ' 58 " W
Ribeirão Pires	PIRE02900	Ponte na Av. Rotary, no bairro Estância Noblesse, quase às margens Res. do Rio Grande	23° 42 ' 52 " S 46° 25 ' 45 " W
Reservatório Guarapiranga	GUAR00900	Na Captação da SABESP junto à casa de Bombas.	23° 40 ' 27 " S 46° 43 ' 40 " W
Reservatório Taiaçupeba	PEBA00900	No Reservatório Taiaçupeba, no corpo central a 1 Km da barragem. A jusante dos braços do Taiaçupeba-Mirim e Taiaçupeba-Guaçu.	23° 34 ' 45 " S 46° 17 ' 30 " W
Córrego Rico	RICO02600	Na captação de Jaboticabal (SAAE)	21° 18 ' 37 " S 48° 19 ' 24 " W
Reservatório Cascata	CASC02050	Manancial de captação de Marília, no Bairro Maria Isabel	22° 12 ' 48 " S 49° 55 ' 22 " W
Reservatório Edgard de Souza	TIES00900	Próximo às comportas da barragem do reservatório, após a rede para retenção de aguapés	23° 27 ' 16 " S 46° 54 ' 36 " W
Ribeirão do Sertãozinho	SETA04600	Ponte a jusante da ETE de Sertãozinho	21° 05 ' 19 " S 48° 02 ' 40 " W
Ribeirão dos Meninos	NINA04900	Ponte da Av. do Estado, na divisa dos municípios de São Paulo e São Caetano do Sul.	23° 36 ' 00 " S 46° 34 ' 48 " W
Ribeirão Preto	RIPE04300	Ponte na Rua Dr. Saraba em Bonfim Paulista, junto a régua do DAEE 4C-018.	21° 16 ' 02 " S 47° 49 ' 08 " W
Rio Pirapora	PORA02700	Ponte próximo à captação de água do município Salto	23° 36 ' 53 " S 47° 35 ' 56 " W
Rio Tietê (Mogi das Cruzes)	TIET02090	Na captação principal do município de Mogi das Cruzes - SEMAE	23° 32 ' 55 " S 46° 08 ' 09 " W
Rio Tietê (Suzano)	TIET03120	A jusante da ETE de Suzano.	23° 30 ' 11 " S 46° 20 ' 13 " W

Fonte: autor

4.2 Metodologia de Coleta

As amostras de água superficial foram coletadas pelos laboratórios da CETESB (Departamento de Análises Ambientais e Departamento de Laboratórios Descentralizados) de acordo com recomendações contidas no Guia Nacional de Coletas de Amostras (ANA, 2011).

As coletas para os ensaios de atividade glicocorticogênica e atividade estrogênica foram coletadas em frascos âmbar de 1 litro com lavagem e aquecimento a 400°C para eliminação de resíduos orgânicos, de acordo com o Guia Nacional de Coletas de Amostras (ANA, 2011). Após a coleta, as amostras foram transportadas sob refrigeração e armazenadas a 4 ± 2 °C até a realização dos procedimentos de extração, realizados em até sete dias após a coleta.

As amostras para os parâmetros físico-químicos e microbiológicos indicadores de contaminação por esgotos foram coletadas, preservadas e transportadas de acordo com o previsto nas metodologias normatizadas de referência (APHA, 2017; ANA, 2011).

4.3 Atividade Glicocorticogênica (AG)

4.3.1 Preparo da Amostra

O preparo de amostras para o bioensaio GR-CALUX consistiu na extração em fase sólida (SPE) conforme protocolo P-BDS-096 da *BioDetection Systems*. Essa técnica envolve a retenção dos compostos de interesse, buscando reduzir os interferentes da matriz e a concentração dos analitos para facilitar a determinação dos compostos encontrados em menor quantidade (LANÇAS, 2004).

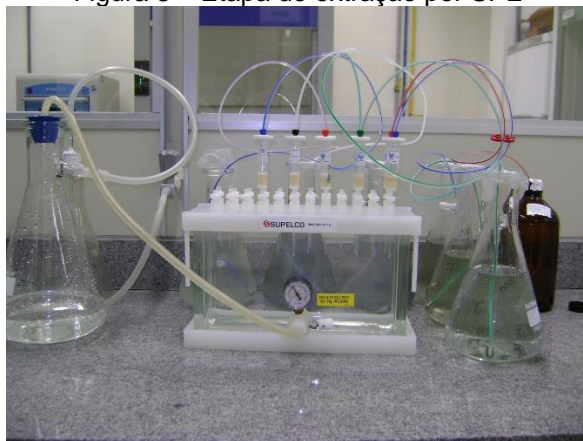
O processo da SPE envolve a passagem da amostra líquida por meio de um sólido que preenche um disco ou cartucho, de forma que os analitos alvos sejam separados da matriz da amostra. As interações do analito com a fase sólida (sorvente) devem ser maiores que as interações do analito com a matriz da amostra, para que o analito fique retido na fase sorvente (LANÇAS, 2004).

Antes da extração, os materiais suspensos foram removidos das amostras por meio de filtração utilizando pré-filtros AP20 e filtros 0,45 µm. A SPE foi realizada a vácuo parcial, utilizando cartuchos HLB (*hydrophilic-lipophilic-balance*) de alta capacidade e com vazão controlada entre 2-4 gotas.s⁻¹. Os cartuchos foram condicionados com 6 mL de metanol e 6 mL de água ultrapura. O sorvente promove para o monômero lipofílico um mecanismo de fase reversa para retenção dos analitos por meio de interações hidrofóbicas, e o polímero hidrofílico tem propriedades umectantes, acarretando na retenção de compostos polares por interações fortes.

Após a percolação das amostras, os cartuchos foram lavados com 6 mL de solução 5% de metanol em água e secos a vácuo por 30 minutos.

A eluição dos cartuchos foi realizada com 6 mL de metanol e as amostras foram acondicionadas em frascos de 10 mL e, posteriormente, concentradas em evaporador. Em seguida as amostras foram transferidas com auxílio do solvente metanol para microtubos de 1,5 mL, concentradas novamente até a total evaporação do metanol, ressuspensas em 25 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) e, então, acondicionadas por até 90 dias em freezer a -20 °C.

Figura 8 – Etapa de extração por SPE



Fonte: Daniela Dayrell França

4.3.2 Cultivo Celular

Os meios de cultura para o cultivo celular são usados para suprir nutrientes, fatores de crescimento e condições adequadas para as células (como pH e pressão osmótica). As células GR-CALUX foram cultivadas utilizando meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com aminoácidos não essenciais e soro fetal bovino e acondicionadas em incubadora de CO₂ (37 °C, 5 % de CO₂).

Figura 9 – Frasco de cultivo celular e incubadora de CO₂



Fonte: Daniela Dayrell França

4.3.3 GR-CALUX

O ensaio foi realizado em microplacas, onde as células foram cultivadas no primeiro dia. No segundo dia de ensaio as células foram expostas às amostras e à substância de referência (dexametasona).

Após 24 horas de exposição, no terceiro dia, foram realizadas as leituras da luminescência utilizando um luminômetro (Victor X3, Perkin Elmer). A atividade das amostras é comparada à atividade da dexametasona e o resultado expresso em ng eq. DEX L⁻¹.

Por tratar-se de ensaio licenciado, os detalhes e especificidades da etapa de ensaio do GR-CALUX constam no protocolo analítico P-BDS-085 da *BioDetection Systems* (2013). O Laboratório de Análises Toxicológicas da CETESB possui contrato com a empresa, o que permite a realização dos ensaios e manutenção das culturas de células.

Figura 10 – Exposição das células à amostra (esquerda) e luminômetro (direita)



Fonte: Daniela Dayrell França

4.4 Ensaios para os Indicadores de Qualidade da Água

Os ensaios para os parâmetros complementares, indicadores da qualidade da água associados à poluição por esgotos, foram realizados pelos laboratórios da CETESB seguindo métodos normatizados e conforme os princípios de qualidade laboratorial exigidos pela NBR ISO/IEC 17025:2017 (Tabela 5).

Tabela 5 – Métodos de análise dos parâmetros indicadores de qualidade da água

Parâmetro	Técnica	Referência
Atividade Estrogênica	Avaliação da presença de agonistas do receptor de estrógeno humano com linhagens BLYES	Sanseverino <i>et. al.</i> , 2005
DBO	Diluição e incubação a 20°C e 5 dias	APHA-AWWA-WEF, 23 ^a Ed., Método 5210-B
COT	Combustão infravermelha	APHA-AWWA-WEF, 23 ^a Ed., Método 5310-B ou 5310-C
E. Coli	Técnica de Membrana Filtrante	APHA-AWWA-WEF, 23 ^a Ed., Método 9213.3b
pH	Eletrometria	APHA-AWWA-WEF, 23 ^a Ed., Método 4500H+ - B
Temperatura	Medição Direta	APHA-AWWA-WEF, 23 ^a Ed., Método 2550
Oxigênio Dissolvido	Eletrodo de Membrana ou Luminescência	APHA-AWWA-WEF, 23 ^a Ed., Método 4500 O – G
Fósforo	Espectrometria ótica de emissão com plasma de argônio – ICP/OES	ASTM D-888, 2018 USEPA, SW 846
Nitrogênio Amoniacal	Cromatografia iônica após destilação	APHA-AWWA-WEF, 23 ^a Ed., Método 4500 NH3
Nitrogênio Total	Kjeldahl Cromatografia iônica após digestão ácida	ISO 14911:1998 APHA-AWWA-WEF, 23 ^a Ed., Método 4500 Norg
Nitrato	Cromatografia iônica	ISO 14911:1998 APHA-AWWA-WEF, 23 ^a Ed., Método 4110 C
Nitrito	Cromatografia iônica	APHA-AWWA-WEF, 23 ^a Ed., Método 4110 C
Turbidez	Nefelometria	APHA-AWWA-WEF, 23 ^a Ed., Método 2130 B
Sólidos Totais	Gravimetria	APHA-AWWA-WEF, 23 ^a Ed., Método 2540
		ABNT/NBR 10664:1989

Fonte: autor

4.5 Análises Estatísticas e Apresentação dos Dados

As análises estatísticas do conjunto de resultados envolveram parâmetros descritivos e de inferência para determinação de possíveis correlações entre os resultados de atividade glicocorticogênica e os valores de atividade estrogênica, parâmetros indicadores de contaminação por esgotos do índice de qualidade das águas (IQA) e carbono orgânico total.

A forma de tratamento dos resultados abaixo do limite de quantificação (LQ) consistiu na divisão desses valores por raiz quadrada de 2 conforme proposto por CROGHAN (2003) e os resultados referentes ao parâmetro *E. Coli* foram utilizados em escala logarítmica decimal (\log_{10}).

Nas situações de ausência de resultados para um ou mais parâmetros, os dados ausentes foram estimados empregando a técnica multivariada de análise de componentes principais (PCA) por meio do método *Expectation – Maximization* (EM) utilizando o software Amelia (JOSSE e HUSSON, 2016; AUDIGIER *et.al*, 2016; HONAKER *et.al.*, 2011). A partir da análise crítica dos valores obtidos, por meio da avaliação do histórico de resultados publicados pela CETESB, alguns desses resultados estimados foram substituídos por valores médios de dados históricos (2015 – 2018) levando em consideração o mês de coleta.

A matriz de correlação foi construída utilizando-se o coeficiente de correlação de *Spearman* (ρ) e a forma de apresentação foi elaborada usando *cluster* hierárquico conforme método de *Ward* (MURDOCH e CHOW, 1996). A técnica multivariada de análise fatorial para dados mistos (FAMD) foi empregada para avaliação conjunta dos dados quantitativos (resultados analíticos) e qualitativos (ponto de coleta, tipo de ambiente e ano de coleta) (PAGÈS, 2004).

A técnica multivariada de componentes principais para dados mistos (KIERS, 1991) foi empregada utilizando o pacote *PCAmixdata* e a identificação simultânea de agrupamentos e parâmetros nas amostras foi realizada pela técnica multivariada *Bicluster* (LEE *et al.*, 2010; MADEIRA e OLIVEIRA, 2004).

As figuras do tipo *heatmaps* (mapas de calor) foram elaboradas empregando o pacote *Heatmaply* de acordo com o proposto por GALILI e outros (2017).

O teste de comparação de medianas empregado na comparação entre os resultados de atividade glicocorticogênica nos diferentes pontos de amostragem, tipos de ambiente e também ao longo dos diferentes anos de coleta, foi o de *Kruskal-Wallis* (HOLLANDER, 1973), pois não assume normalidade na distribuição dos dados.

Para a comparação entre duas medias, no caso dos dois tipos ambientes pesquisados (lótico e lântico), foi utilizado o teste *Mann-Whitney* conforme descrito por BAUER (1972).

O método de modelagem empregada neste estudo foi o *Generalized Additive Models for Location, Scale and Shape* (GAMLSS) conforme publicado por RIGBY (2005). Nesta metodologia a primeira tarefa é a identificação de qual distribuição segue a variável resposta, ou seja, a variável de interesse do estudo,

em nosso caso a atividade glicocorticogênica (GR-CALUX). Na segunda etapa ajusta-se o modelo de maneira iterativa, partindo de um modelo saturado e retiram-se as variáveis, uma a uma, de acordo com o nível de significância, do maior para o menor, dos parâmetros associados a elas (variáveis preditivas) até que só restem no modelo variáveis com contribuição significativa ($p < 0.05$).

A última etapa do processo consiste na validação do comportamento dos resíduos do modelo, ou seja, não devem ser correlacionados, ter média zero e variância 1 e devem aderir à distribuição normal ou Gaussiana. Essa abordagem é multivariada, ou seja, holística, levando todas as variáveis simultaneamente em consideração.

O programa em R, versão 4.0.2, criado para fazer todas as análises e figuras foi elaborado utilizando o *RStudio Version 1.1.463* e o nível de significância adotado foi de 5% para todos os testes estatísticos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividade Glicocorticogênica

Os valores da atividade glicocorticogênica (AG) medidos nos rios e reservatórios durante o período de estudo variaram entre resultados menores que o limite de quantificação (<LQ) e 44,0 ng eq. DEX L⁻¹. Dentre os 19 locais avaliados, apenas Rio Capivari, Ribeirão Pires, Ribeirão Preto e Ribeirão dos Meninos apresentaram resultados quantificáveis no teste GR-CALUX em pelo menos uma das amostras analisadas, representando 10% das 70 amostras analisadas.

Nas Tabelas 6 e 7 são apresentadas as estatísticas descritivas para cada ponto no período do estudo considerando dados brutos e dados transformados, respectivamente. Dos 7 resultados quantificáveis para AG, 5 foram encontrados em meses com menores índices pluviométricos (Abril – Setembro), corroborando que variações sazonais devem ser consideradas para compreensão da concentração de contaminantes ambientais, com atenção especial para chuvas que podem afetar a diluição de compostos, principalmente em rios e ribeirões (OLIVEIRA, 2017).

Os resultados obtidos assemelham-se aos resultados encontrados em águas superficiais da Holanda, onde os valores variaram entre <LQ e 2,30 ng eq. DEX.L⁻¹ e na China onde os resultados para diversos glicocorticoides variaram entre 0,02 e 4,2 ng.L⁻¹ (VAN DER LIDEN et al., 2010; SCHRIKS et al., 2013; CHANG et al., 2007).

Os resultados de atividade glicocorticogênica encontrados em rios da República Checa e Suíça também apresentaram resultados na mesma ordem de grandeza que o presente estudo, sendo que os valores foram entre <LQ e 2,6 ng eq. DEX.L-1 (MACIKOVA et al. 2014).

Estudos publicados reportaram resultados de até 94 ng. L⁻¹ de glicocorticoides em rios chineses (SHEN et al., 2020) e nos Estados Unidos 27% dos pontos investigados apresentaram algum nível de atividade, porém os valores não foram publicados (STAVREVA et al., 2012).

Tabela 6 – Estatística descritiva - Resultados de AG (Dados Brutos)

Atividade Glicocorticogênica (ng eq. Dex. L⁻¹)		
Corpo D'água	(n)	Mínimo - Máximo
1 Rio das Araras	10	<LQ
2 Rio Atibaia	3	<LQ
3 Rib. Das Graças	9	<LQ
4 Rio Cotia	2	<LQ
5 Rio Capivari	11	<LQ - 11
6 Rio Jundiá	4	<LQ
7 Rio Piracicaba	5	<LQ
8 Ribeirão Pires	9	<LQ - 9,9
9 Res. Guarapiranga	2	<LQ
10 Res. Taiaçupeba	3	<LQ
11 Córrego Rico	1	<LQ
12 Reservatório Cascata	3	<LQ
13 Reservatório Edgard de Souza	1	<LQ
14 Ribeirão do Sertãozinho	1	<LQ
15 Ribeirão dos Meninos	1	44
16 Ribeirão Preto	1	8,7
17 Rio Pirapora	1	<LQ
18 Rio Tietê E Mogi das Cruzes	3	<LQ
19 Rio Tietê - Suzano	1	<LQ

Fonte: autor

O estudo publicado por DANIELS e colaboradores (2018), identifica decréscimo nos resultados para glicocorticoides em rios conforme aumento da distância em relação às fontes de descarga de esgotos, o que é corroborado por meio da quantificação de AG apenas nos pontos mais próximos de lançamentos de esgotos: Rio Cotia, próximo a diversos lançamentos irregulares de esgoto, Rio Capivari e Ribeirão Pires localizados a jusante de pequenas ETEs e Ribeirão dos Meninos localizado a jusante de uma grande ETE na região metropolitana de São Paulo e que também recebe grande aporte de esgoto proveniente de moradias irregulares.

Todos os resultados encontrados estão abaixo do valor 21 ng eq. Dex.L⁻¹ proposto por BRAND e colaboradores (2008) como nível seguro em relação ao risco à saúde humana e também abaixo das concentrações que provocaram efeitos deletérios em peixes nos estudos levantados (MCNEIL *et al.*, 2016; WILLI *et al.*, 2017;2019), embora KUGATHA e SUMPTER (2011) tenham concluído que concentrações abaixo de 100 ng.L⁻¹ sejam ambientalmente relevantes.

Tabela 7 – Estatística descritiva - Resultados de AG (Dados Transformados)

Atividade Glicocorticogênica (ng eq. Dex. L⁻¹)

Corpo D'água	Mínimo	Q₁	Mediana	Média	Q₃	Máximo	Desvio Padrão
1 Rio das Araras	1,6	4,6	4,6	4,2	4,6	4,6	1,0
2 Rio Atibaia	1,6	2,4	3,1	3,1	3,9	4,6	1,5
3 Rib, Das Graças	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	0,0
4 Rio Cotia	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	0,0
5 Rio Capivari	1,6	1,9	3,3	3,9	4,6	11	2,7
6 Rio Jundiá	3,1	4,2	4,6	7,0	7,4	15,6	5,8
7 Rio Piracicaba	3,1	4,6	4,6	4,3	4,6	4,6	0,7
8 Ribeirão Pires	1,6	4,6	4,6	5,0	4,6	9,9	2,4
9 Res, Guarapiranga	1,6	5,1	8,6	8,6	12,1	15,6	9,9
10 Res, Taiaçupeba	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	0,0
11 Córrego Rico	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	-
12 Reservatório Cascata	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	0,0
13 Reservatório Edgard de Souza	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	-
14 Ribeirão do Sertãozinho	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	-
15 Ribeirão dos Meninos	44	44	44	44	44	44	-
16 Ribeirão Preto	8,7	8,7	8,7	8,7	8,7	8,7	-
17 Rio Pirapora	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	-
18 Rio Tietê Ë Mogi das Cruzes	3,1	3,9	4,6	4,1	4,6	4,6	0,9
19 Rio Tietê - Suzano	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	-

Fonte: autor

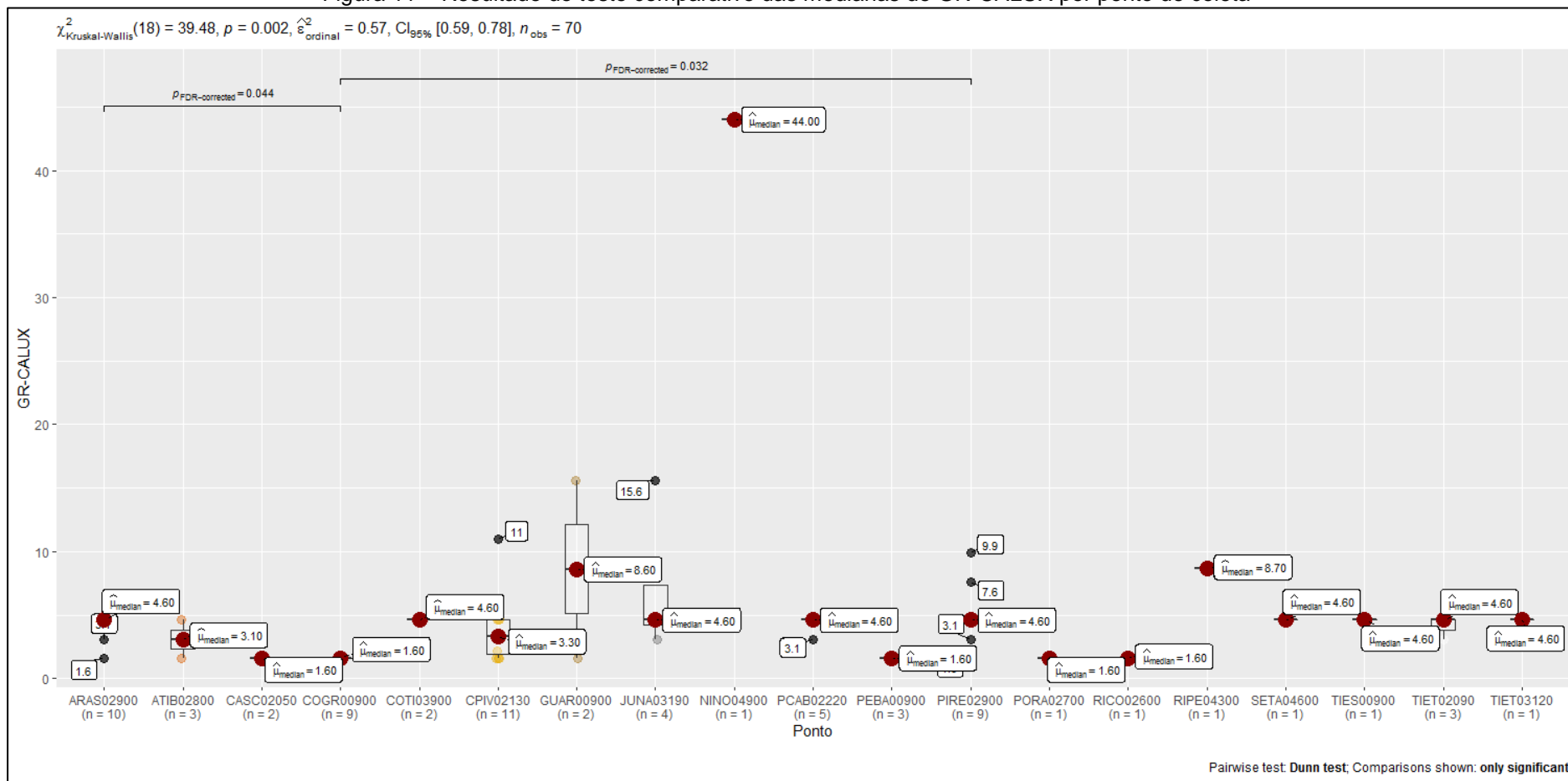
Na Figura 11 estão apresentados os resultados da aplicação do *Teste de Kruskal-Wallis* para comparação das medianas de GR-CALUX por ponto. Pode-se observar que somente duas diferenças puderam ser evidenciadas com base neste conjunto de dados: Rio Araras e Res. Graças (ARAS02900 x COGR00900) e Reservatório das Graças e Ribeirão Pires (COGR00900 x PIRE02900).

A estatística do teste teve valor observado igual a $V\chi = 39,48$ com $p=0,002$, porém deve-se ressaltar que foram analisadas poucas amostras por ponto de coleta.

Nas figuras 12 e 13 constam os resultados dos testes de comparação entre os tipos de ambiente (lênticos e lótico) e entre os resultados para os anos 2018, 2019 e 2020, respectivamente.

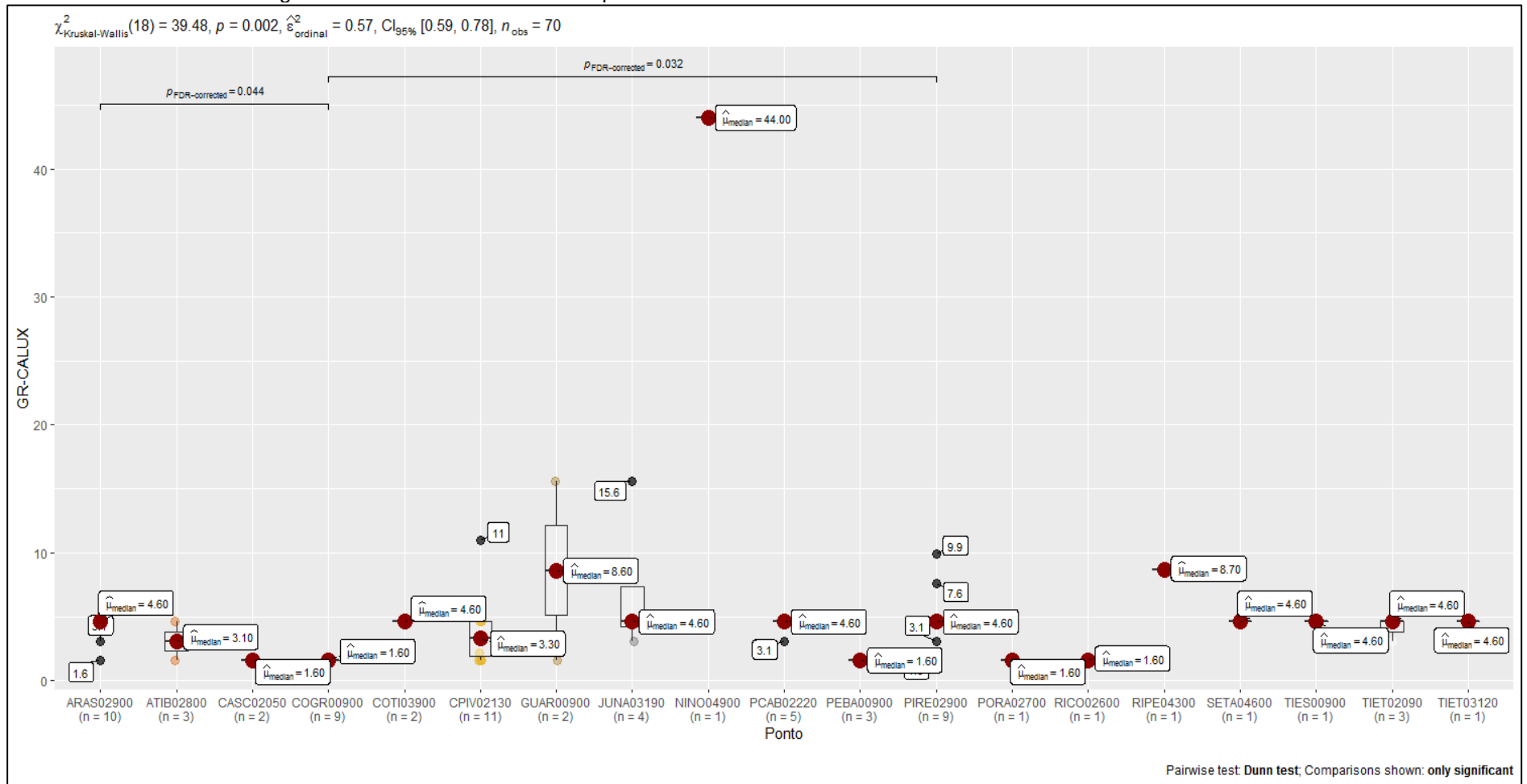
A mediana de atividade glicocorticogênica no ambiente lêntico foi significativamente inferior àquela no ambiente lótico com valor observado igual a $V\chi = 4,97$ com $p < 0,0001$. Não foram observadas diferenças significativas entre as medianas de GR-CALUX ao longo dos anos de 2018 a 2020, podendo ser consideradas equivalentes e indicando que, para os pontos estudados, não houve impacto devido ao possível aumento do uso de GCs no cenário pandêmico do ano de 2020.

Figura 11 – Resultado do teste comparativo das medianas de GR-CALUX por ponto de coleta



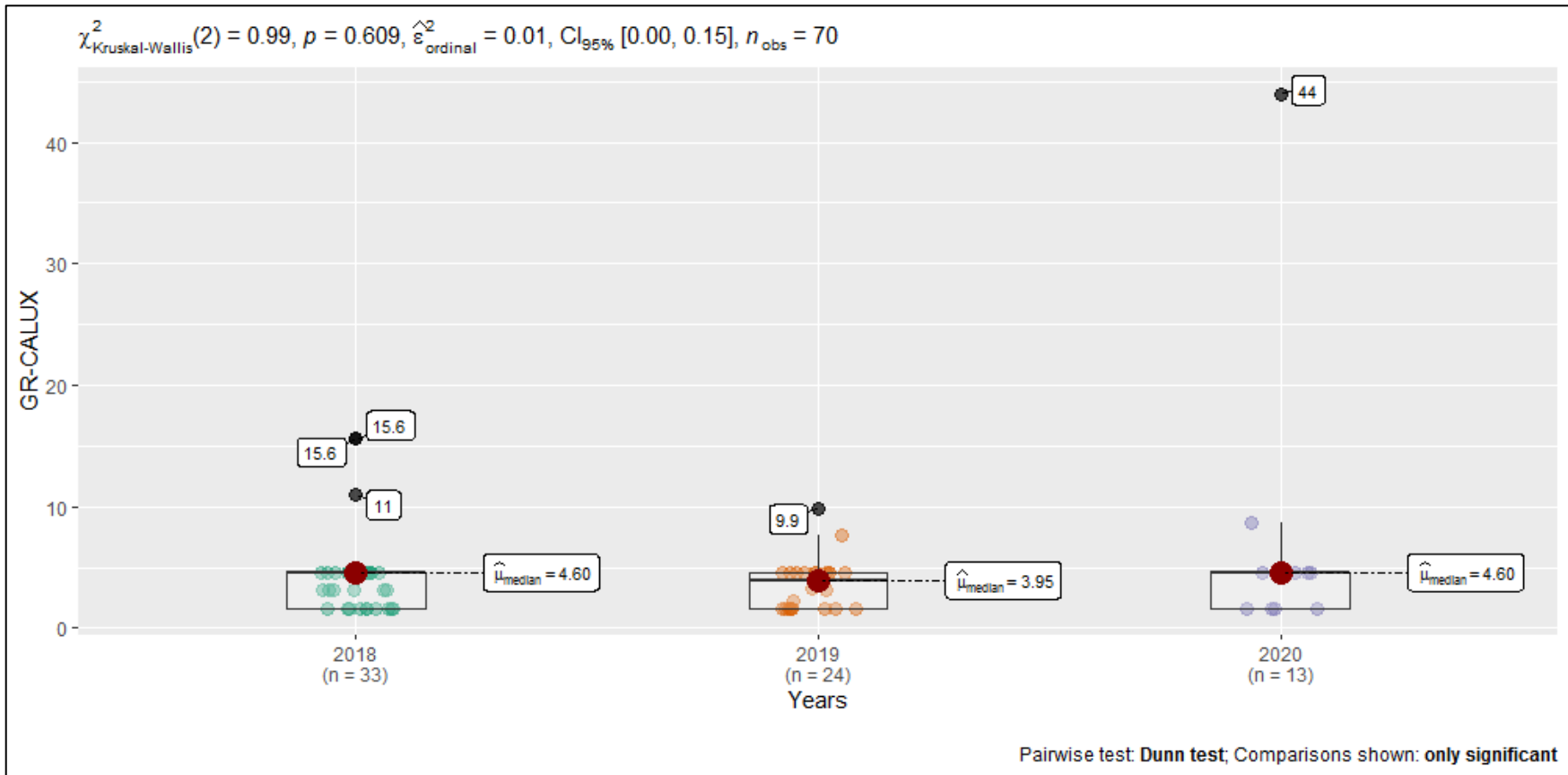
Fonte: autor

Figura 12 – Resultado do teste comparativo das medianas de GR-CALUX nos ambientes lântico e lótico



Fonte: autor

Figura 13 – Resultados do teste comparativo das medianas de GR-CALUX nos anos 2018, 2019 e 2020

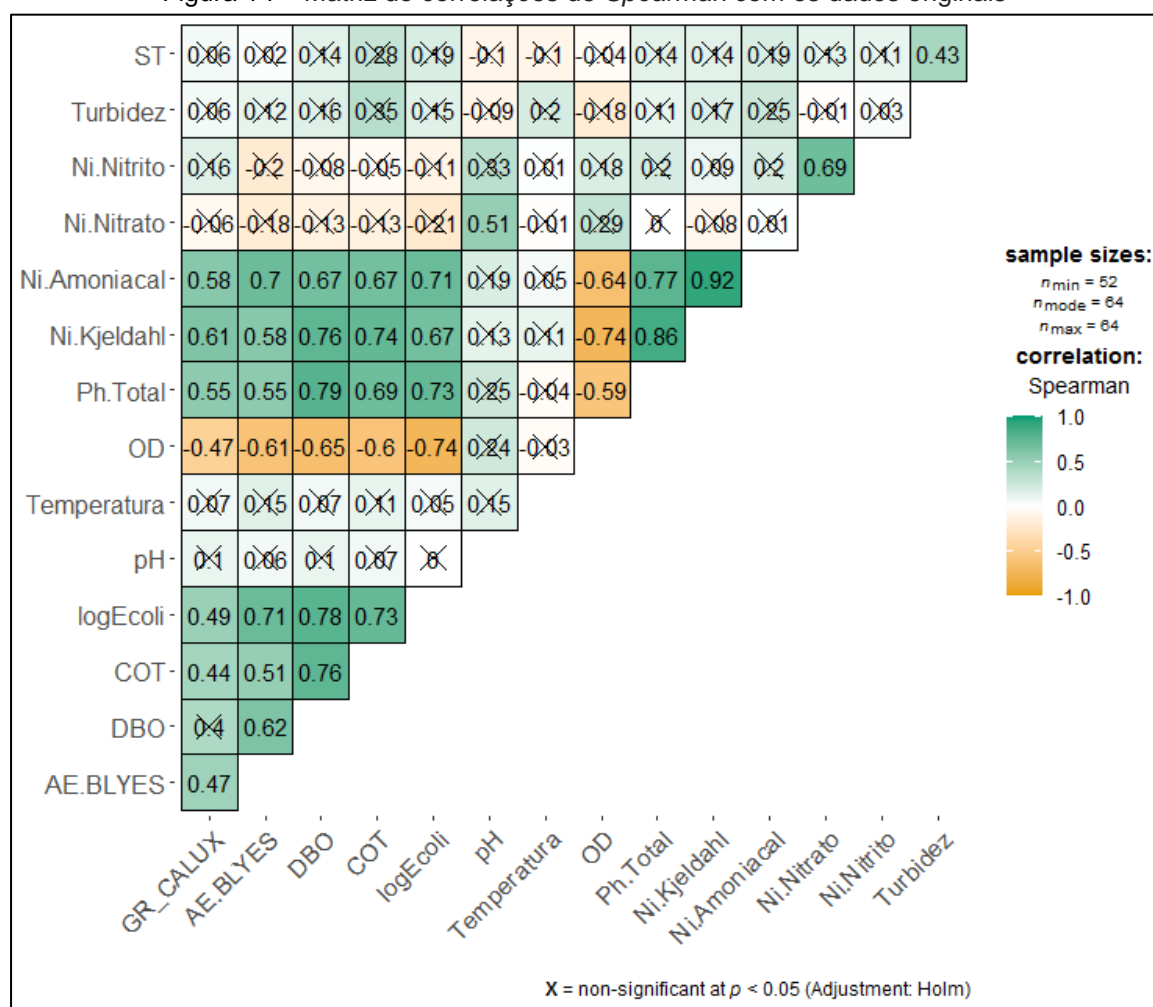


Fonte: autor

5.2 Correlação com Atividade Estrogênica e Indicadores de Qualidade de Água

Na Figura 14 estão apresentadas as medidas de correlação de *Spearman* calculadas com base nos dados originais. Foram 52 amostras com dados completos para todos os parâmetros. Os valores não significativos a 5% aparecem riscados, os valores em verde indicam associação direta e aqueles em laranja indicam associação inversa.

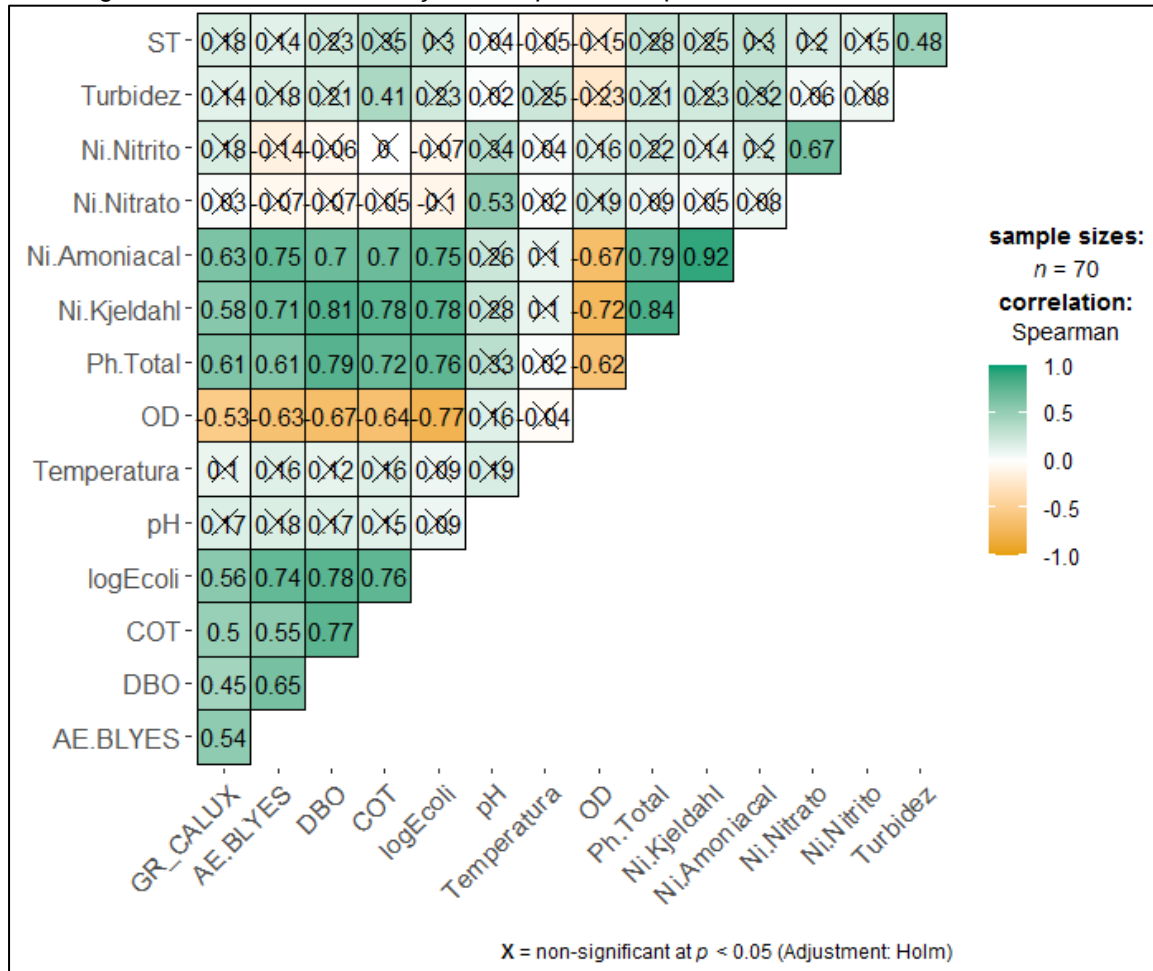
Figura 14 – Matriz de correlações de *Spearman* com os dados originais



Fonte: autor

O número de registros inicialmente disponíveis foi de 52 sendo que as ausências de dados em sua maioria foram de parâmetros físico-químicos. Na Figura 15 está apresentada a matriz de correlações de *Spearman* calculada com base em todos os 70 registros, incluindo, portanto, os dados estimados para os valores ausentes.

Figura 15 – Matriz de correlações de Spearman após tratamento dos dados ausentes



Fonte: autor

Observa-se, na comparação dos resultados expostos nas Figuras 14 e 15, que a estrutura de dependência entre as variáveis não foi alterada, pois os valores e sentidos das correlações se mantiveram, assim como as suas significâncias.

Por meio deste procedimento foi possível utilizar os resultados das 70 amostras feitas para o parâmetro de interesse (GR-CALUX.) Os dados completos estão apresentados no Apêndice A.

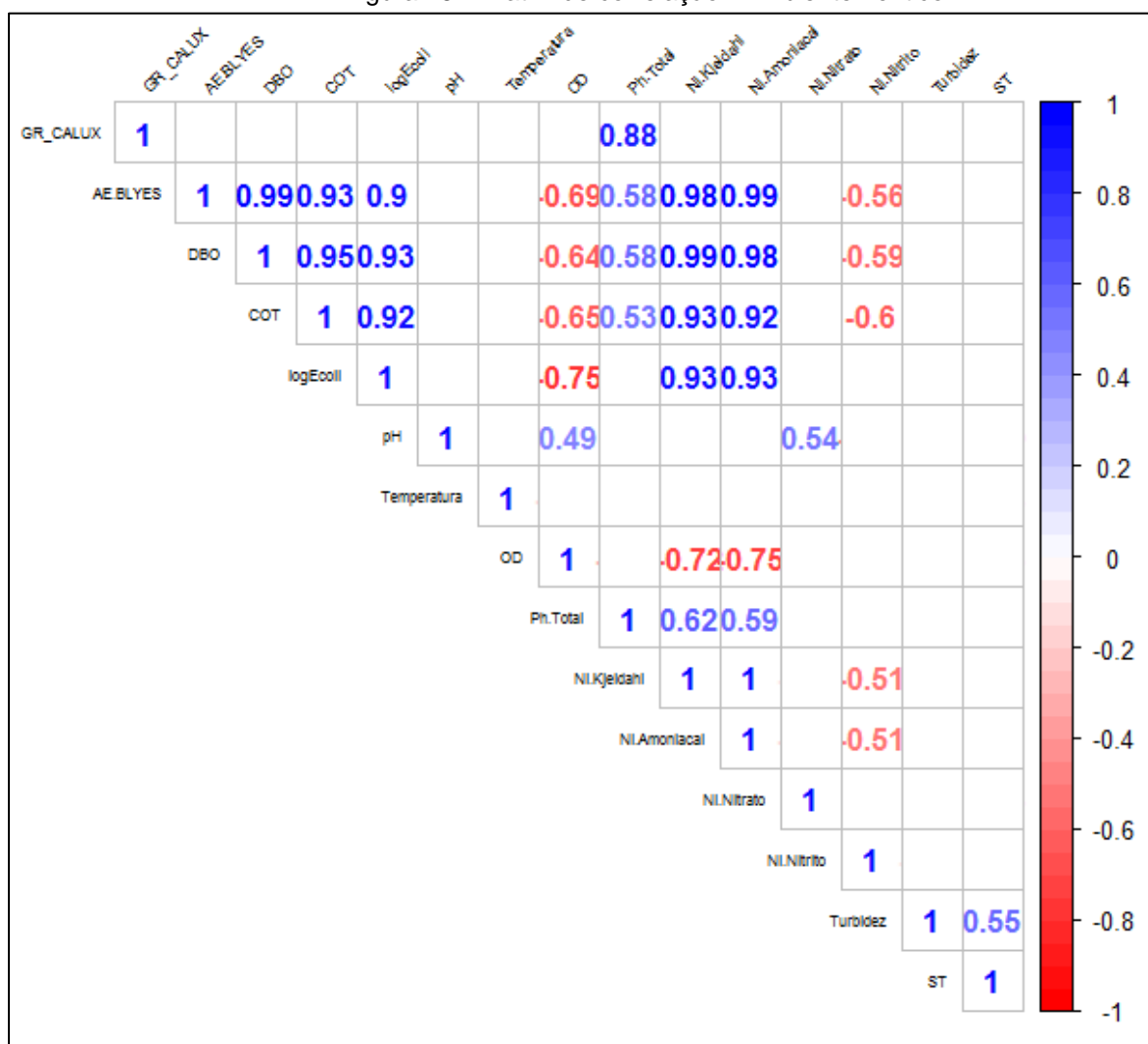
A estrutura de correlações descrita na Figura 15 aponta associação direta com os parâmetros nitrogênio amoniacal, nitrogênio *Kjeldahl*, fósforo total, *E. Coli*, COT, DBO e atividade estrogênica (que também estão diretamente correlacionadas entre si) e uma correlação inversa delas com o parâmetro oxigênio dissolvido.

Ainda com base na Figura 15, percebe-se que os parâmetros nitrito e nitrato apresentam correlação direta entre si, mas os resultados de nitrito não se associaram aos demais parâmetros e o indicador nitrato se correlacionou de

maneira direta somente com o pH. Turbidez se correlacionou de maneira direta somente com sólidos totais. As demais correlações não apresentaram significância estatística com base neste conjunto de dados.

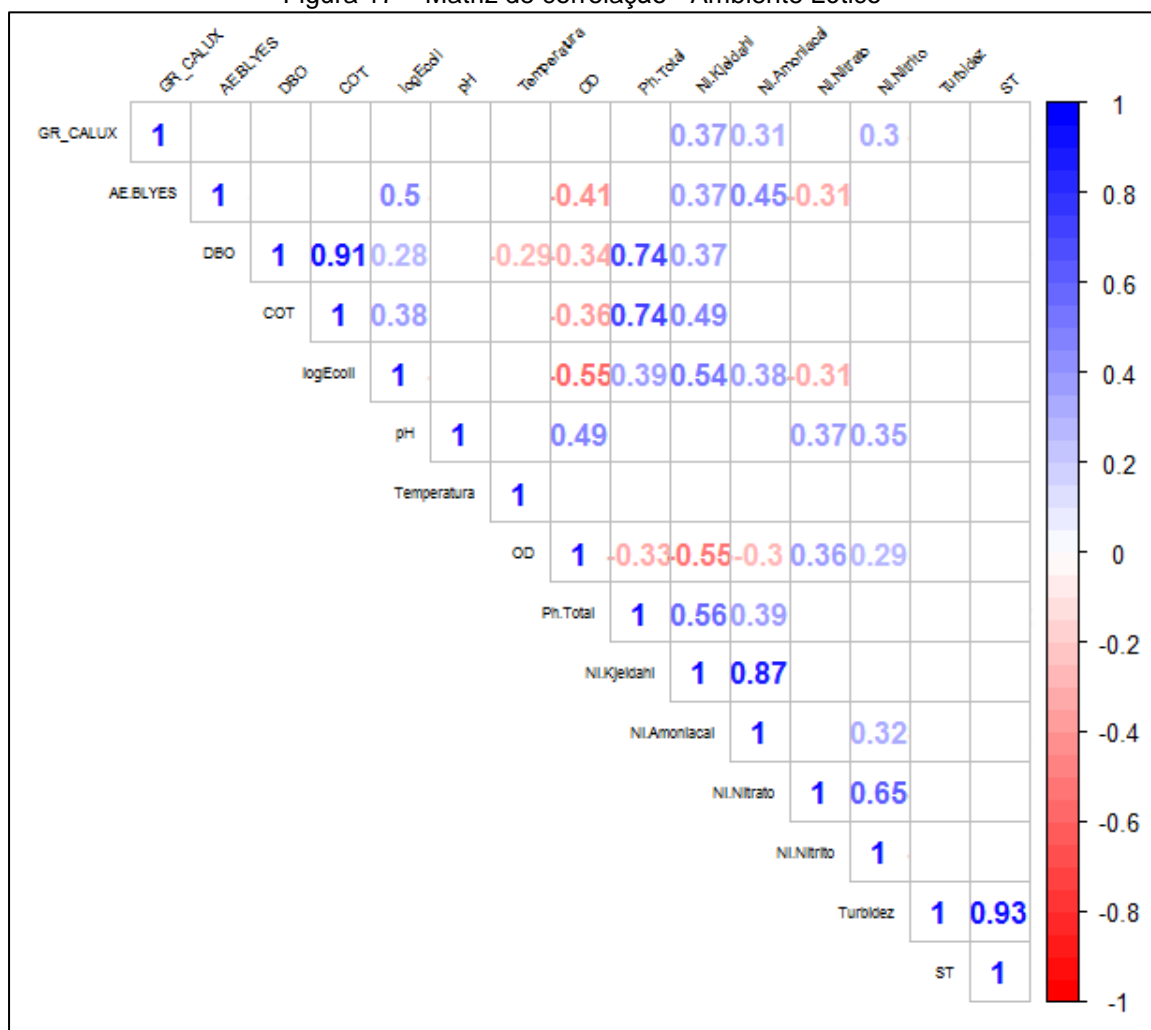
Nas Figuras 16 e 17 estão apresentadas as matrizes de correlação separadas pelos tipos de ambientes, lântico e lótico, respectivamente. A partir da análise dos dados, constata-se algumas diferenças nas relações entre os diversos parâmetros analisados, porém este comportamento em parte é devido ao pequeno número de amostras coletadas em ambiente lântico (17) em comparação com amostras oriundas de ambiente lótico (53).

Figura 16 – Matriz de correlação - Ambiente Lântico



Fonte: autor

Figura 17 – Matriz de correlação - Ambiente Lótico

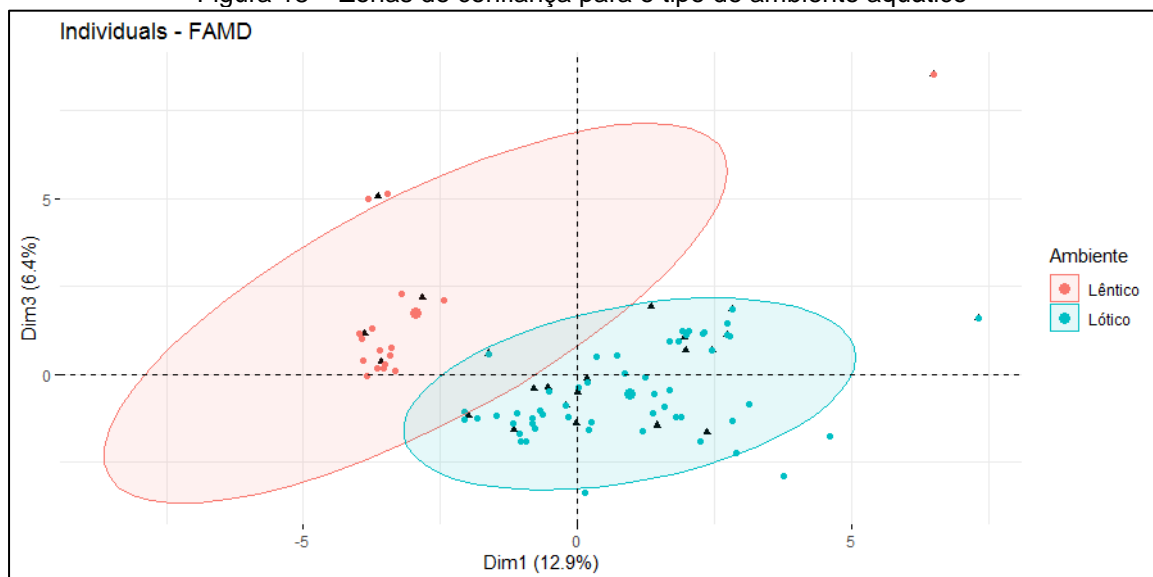


Fonte: autor

Ressaltam-se as correlações opostas para o nitrito que foram negativas para o ambiente lântico e positivas para o lótico. As correlações entre nitrogênio amoniacal com atividade estrogênica, DBO, COT e *E.Coli* foram mais fortes no ambiente lântico e este fato aponta para a necessidade de controle do tipo de ambiente na construção do modelo estatístico.

Na Figura 18 estão apresentadas as zonas de confiança para os tipos de ambientes (lântico e lótico) e pode-se observar que há forte indício de que os ambientes lântico e lótico se comportam de maneira distinta em relação a todos os parâmetros analisados. Especificamente para atividade glicocorticogênica a análise univariada também apontou essa diferença.

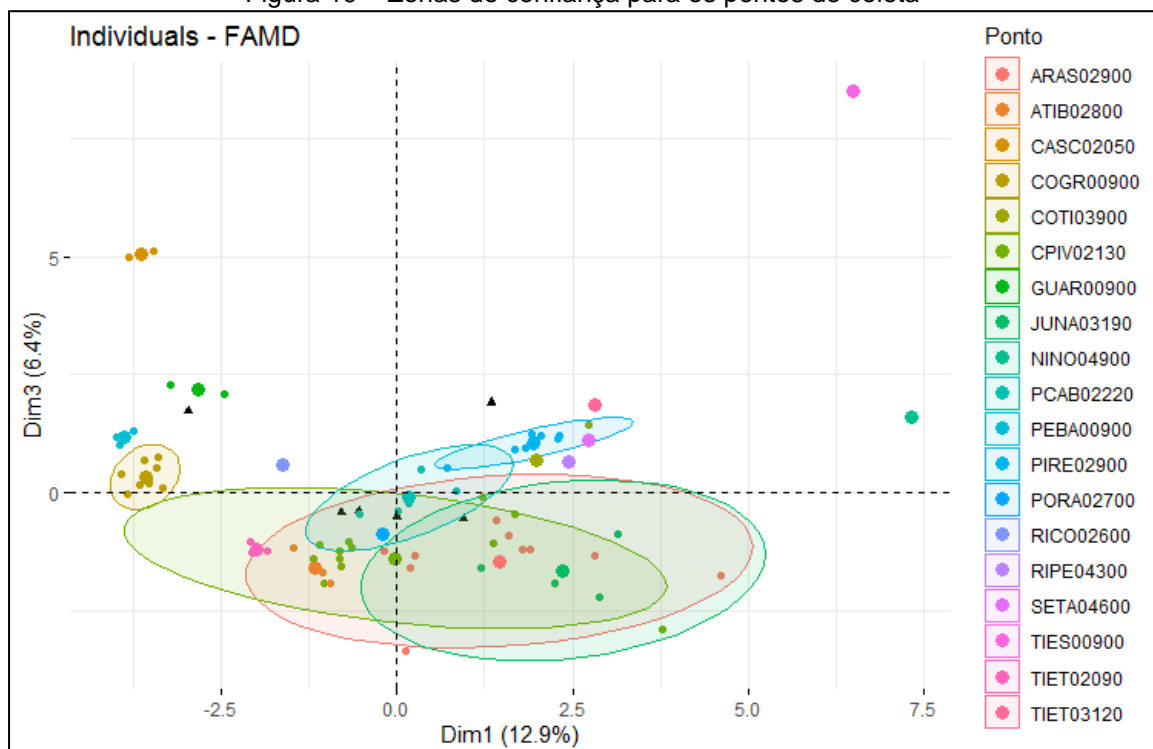
Figura 18 – Zonas de confiança para o tipo de ambiente aquático



Fonte: autor

Na Figura 19 está apresentado o resultado comparativo das zonas de confiança para os pontos de coleta. Como são em grande número, segue também a Figura 17 com os nomes indicados junto ao resultado observado.

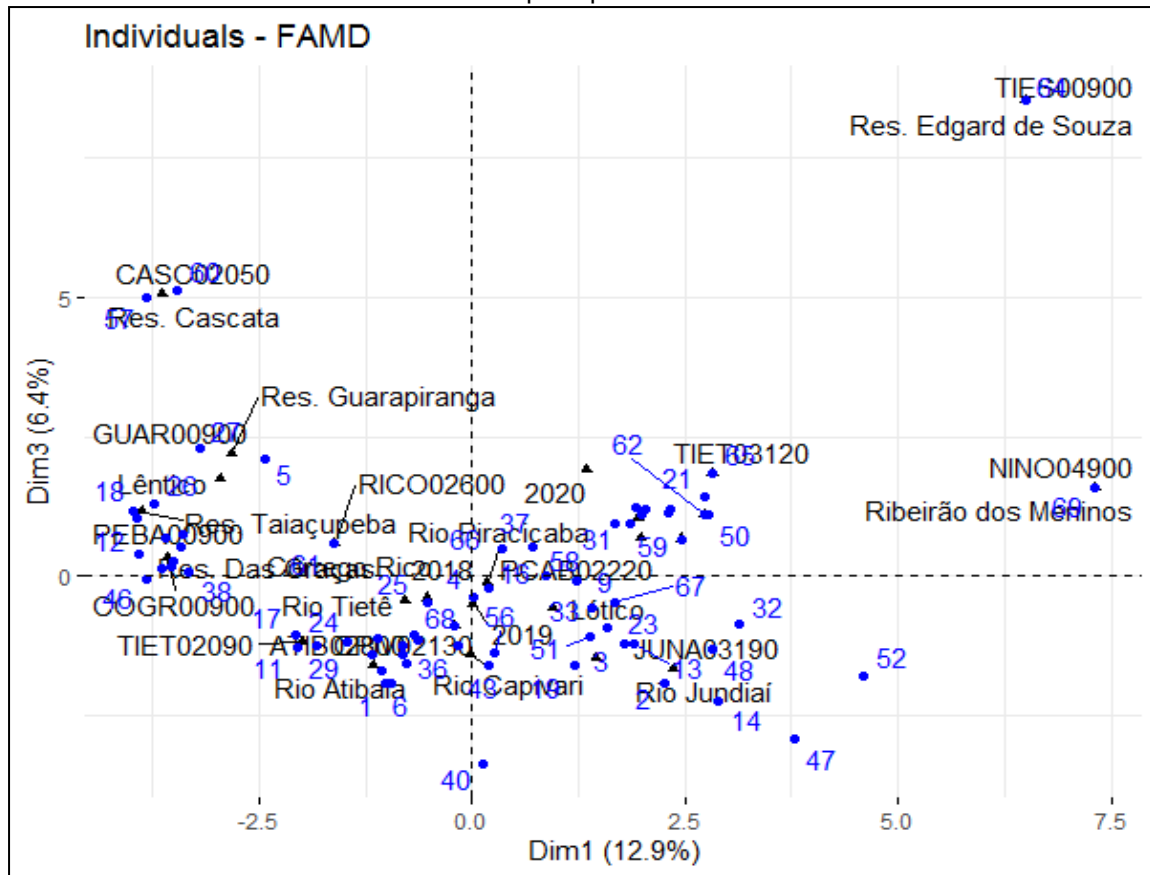
Figura 19 – Zonas de confiança para os pontos de coleta



Fonte: autor

Nota-se, a partir da Figura 20 que identifica os pontos de coleta, que alguns pontos aparecem isolados pois tem-se somente uma amostra daquele ponto. O ponto COGR00900 se diferenciou dos demais, apresentando dados bastante consistentes e distintos dos demais.

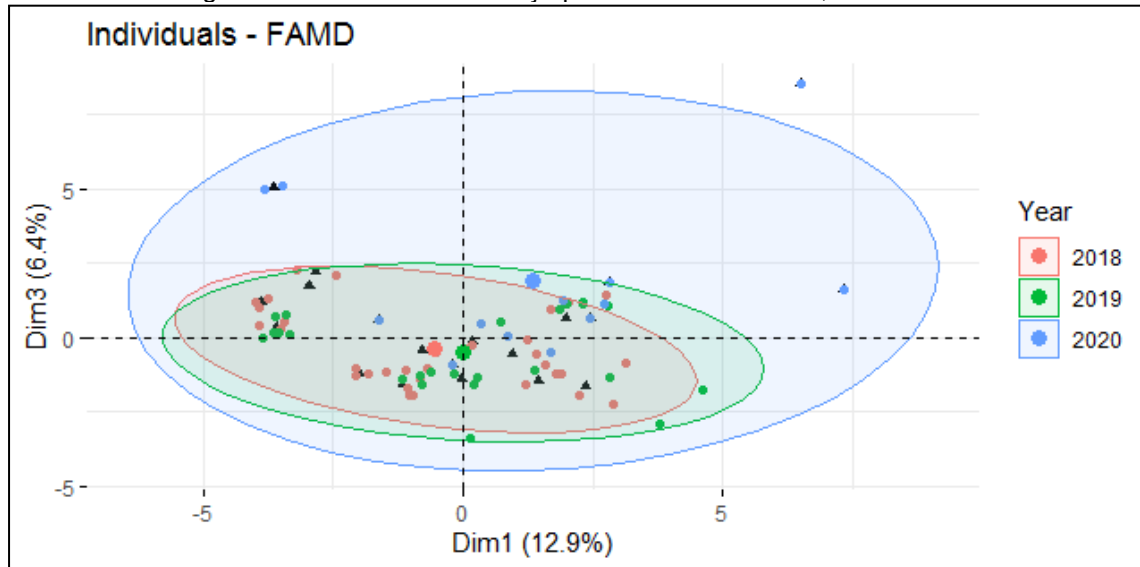
Figura 20 – Pontos de coleta segundo os resultados da primeira e terceira componentes principais



Fonte: autor

Na Figura 21 estão apresentadas as zonas de confiança para os anos de 2018, 2019 e 2020 e observa-se que os resultados dos parâmetros avaliados podem ser considerados equivalentes. Porém, vale também destacar que para o ano de 2020 a variabilidade foi maior possivelmente devido a dois fatores: o número de coletas foi menor neste ano e foram observados valores bastante elevados em relação aos anos anteriores.

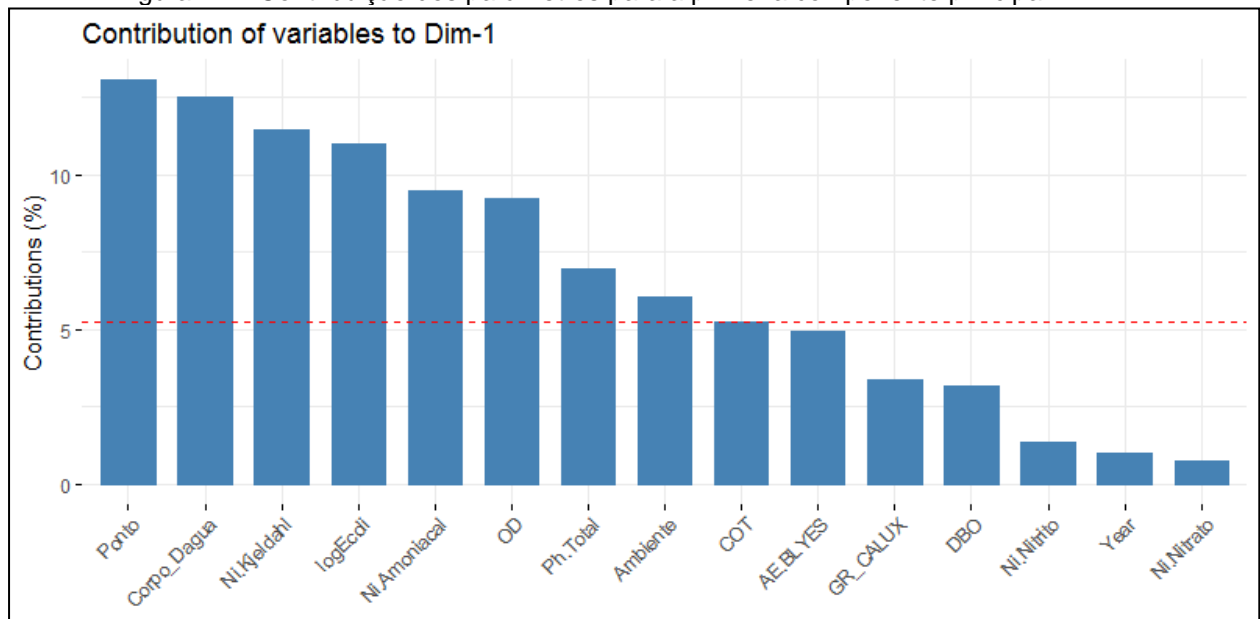
Figura 21 – Zonas de confiança para os anos de 2018, 2019 e 2020



Fonte: autor

Nas Figura 22 e 23 constam, respectivamente, a composição da primeira e da terceira componentes principais e apontam a contribuição de cada uma das variáveis. O traço em vermelho indica o valor de corte abaixo do qual não é significativa a contribuição.

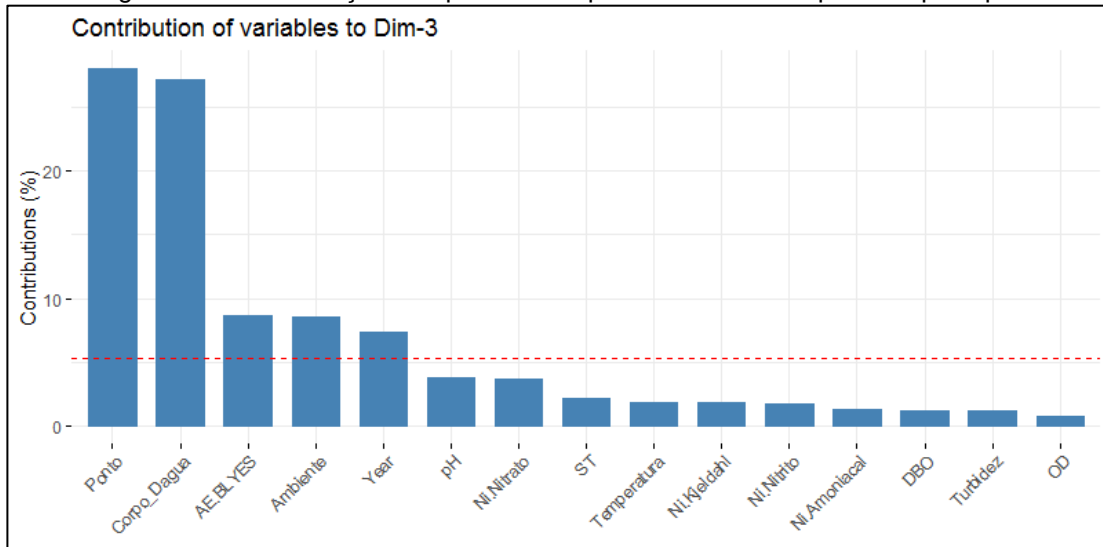
Figura 22 – Contribuição dos parâmetros para a primeira componente principal



Fonte: autor

Esta componente discrimina os pontos segundo os níveis de nitrogênio *Kjeldahl*, nitrogênio amoniacal, *E. Coli*, OD e fósforo total, além do tipo de ambiente. Os demais parâmetros não apresentaram contribuição significativa. A Figura 24 apresenta todas as medidas de correlação entre os parâmetros analisados, projetados na primeira e terceira componentes principais.

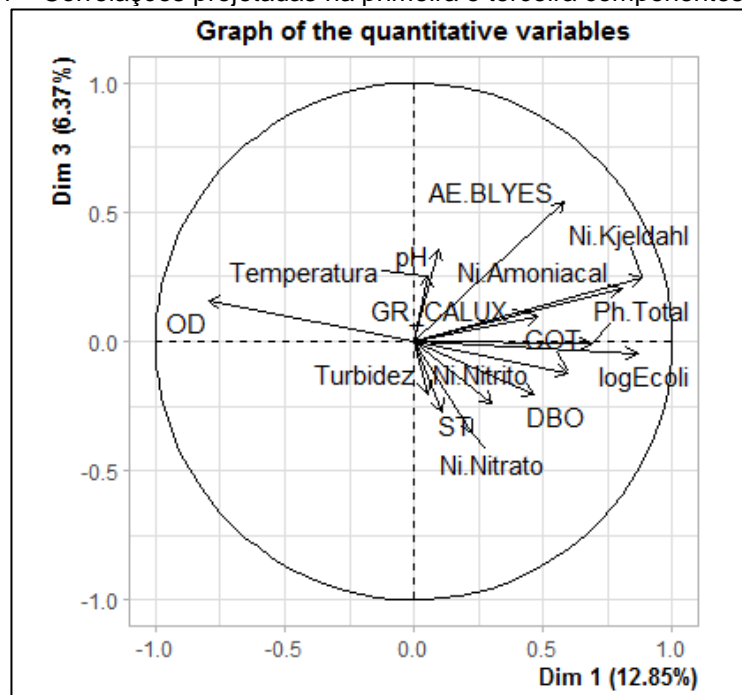
Figura 23 – Contribuição dos parâmetros para a terceira componente principal



Fonte: autor

Esta componente discrimina os pontos segundo os níveis atividade estrogênica, tipo de ambiente e ano. Os demais parâmetros não apresentaram contribuição significativa.

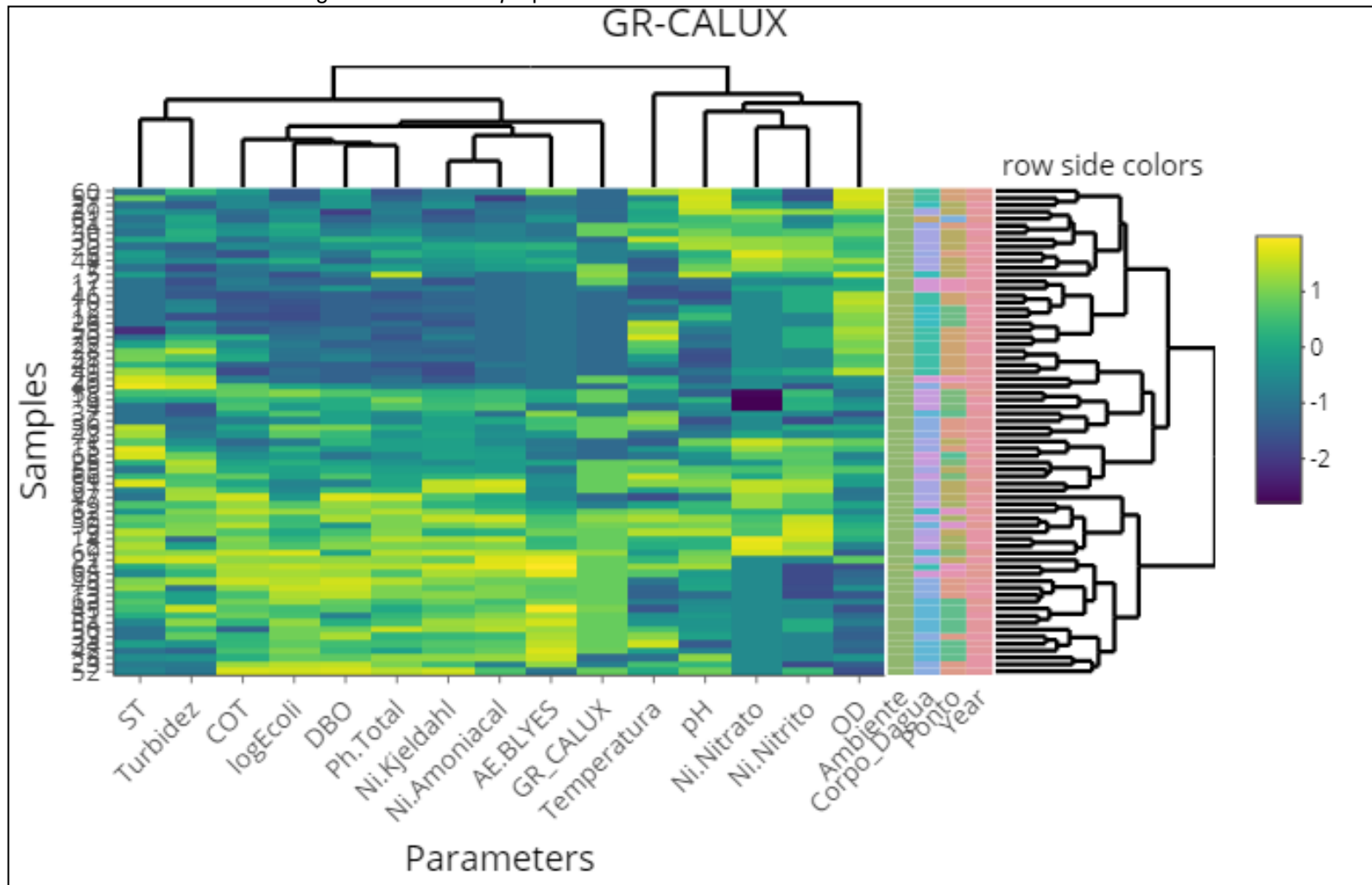
Figura 24 – Correlações projetadas na primeira e terceira componentes principais



Fonte: autor

A Figura 25, a seguir, apresenta de forma gráfica todos os dados, agrupados de maneira bidirecional (variáveis e casos) na forma de mapa de intensidade de cores (heatmap). Para sua elaboração os dados de cada variável foram padronizados, assim temos uma escala única de cores para indicar os valores.

Figura 25 – Heatmap apresentando todos os resultados de todas as amostras

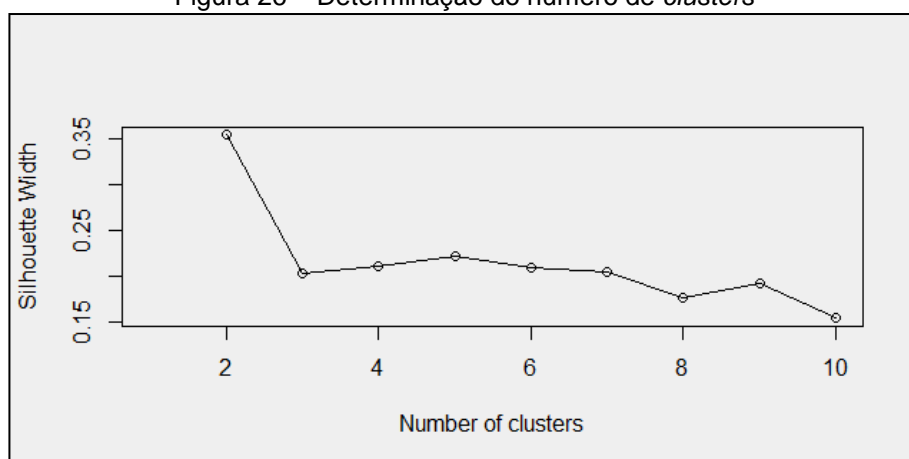


Fonte: autor

Nesta Figura 25 observamos o mesmo resultado apresentado na Figura 24, uma vez que o ensaio GR-CALUX está no agrupamento de variáveis que contém COT, *E.Coli*, DBO, fósforo total, nitrogênio *Kjeldahl*, nitrogênio amoniacal e atividade estrogênica.

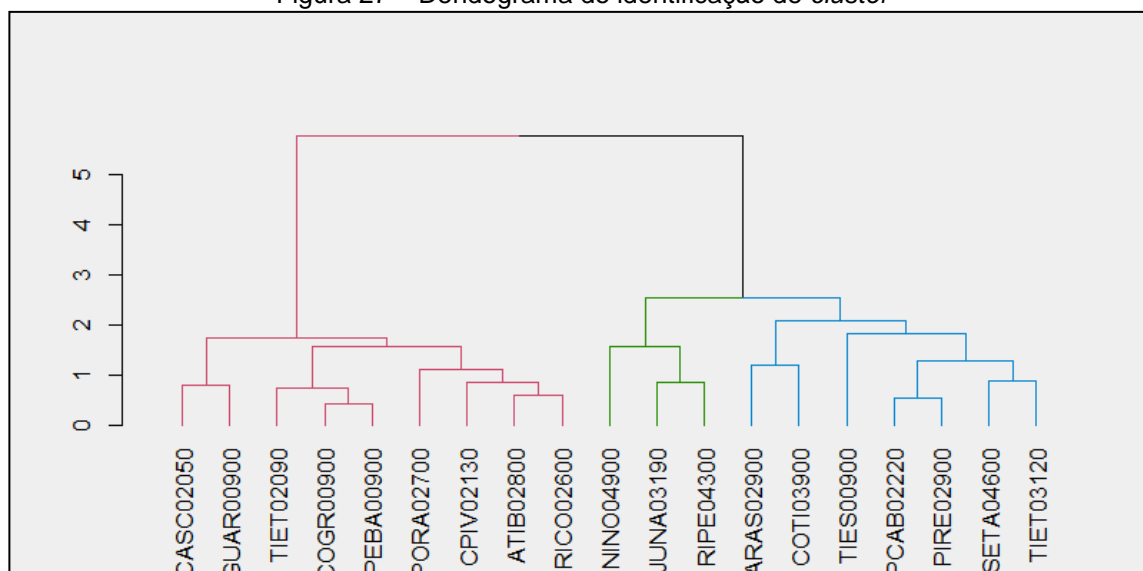
A Figura 26 apresenta o resultado da técnica para determinação do número ideal de clusters na aplicação técnica multivariada de análise de *clusters* e a Figura 27 evidencia o resultado da aplicação desta técnica, na forma de um dendrograma, expondo a formação dos *clusters* segundo o grau de similaridade entre os pontos.

Figura 26 – Determinação do número de *clusters*



Fonte: autor

Figura 27 – Dendrograma de identificação de *cluster*



Fonte: autor

A Tabela 8, construída com base na análise de *clusters*, apresenta as características de cada um dos parâmetros monitorados (valores baixos, intermediários ou altos) e um representando para cada um dos grupos.

Tabela 8 – Caracterização dos *Clusters* segundo cada uma das variáveis

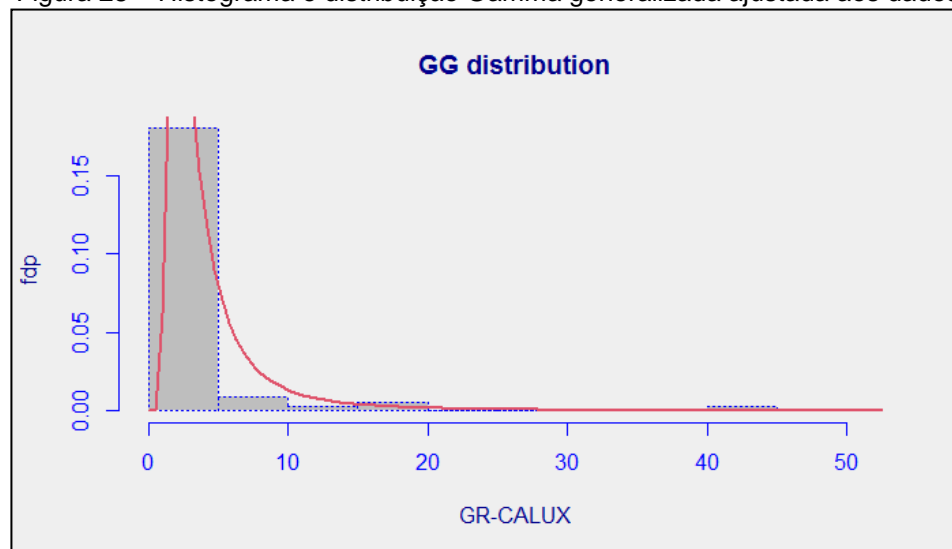
Parâmetro	Cluster (Ponto Representante)		
	1 (PCAB02220)	2 (PEBA00900)	3 (JUNA03190)
Atividade Glicocorticogênica	Intermediário	Baixo	Alto
Atividade Estrogênica	Intermediário	Baixo	Alto
DBO	Intermediário	Baixo	Alto
COT	Intermediário	Baixo	Alto
<i>E. Coli</i>	Intermediário	Baixo	Alto
pH	Baixo	Intermediário	Alto
Temperatura	Intermediário	Baixa	Alta
OD	Baixo	Alto	Intermediário
Fósforo Total	Intermediário	Baixo	Alto
Nitrogênio Kjeldahl	Intermediário	Baixo	Alto
Nitrogênio Amoniacal	Intermediário	Baixo	Alto
Nitrato	Intermediário	Baixo	Alto
Nitrito	Intermediário	Baixo	Alto
Turbidez	Alta	Baixa	Intermediária
Sólidos Totais	Intermediário	Baixo	Alto

Fonte: autor

A partir da análise de clusters e da Tabela 8 pode-se direcionar a escolha de novos pontos de coleta para avaliação da atividade glicocorticogênica, ou seja, com base em resultados históricos para os demais parâmetros com comportamentos similares ao do *cluster* C3, prioriza-se a escolha para aqueles pontos onde provavelmente os valores de GR-CALUX seriam mais elevados.

Seguindo o método de modelagem *Generalized Additive Models for Location, Scale and Shape* (GAMLSS), a Figura 28 apresenta o histograma e a distribuição que melhor se ajustou aos dados (Gamma Generalizada – GG). No apêndice B estão os dados detalhados do ajuste.

Figura 28 – Histograma e distribuição Gamma generalizada ajustada aos dados



Fonte: autor

O modelo final ajustado, que contém somente variáveis com contribuição significativa para explicar as variações de atividade glicocorticogênica, apresentou os resultados expostos na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultados do ajuste final para o modelo de previsão da AG

VARIÁVEL	Estimativa	Erro padrão	t value	Pr(> t)
Ambiente Léntico	0.3426069	0.1131429	3.028	0.003584
Ambiente Lótico	0.7975094	0.1304599	6.113	7.16E-008
Nitrogênio Amoniacal	0.0437709	0.0119054	3.677	0.000496
DBO	-0.0168659	0.0049925	-3.378	0.001265
COT	0.0362888	0.0112159	3.235	0.00195
Turbidez	-0.000596	0.0001671	-3.567	0.000702

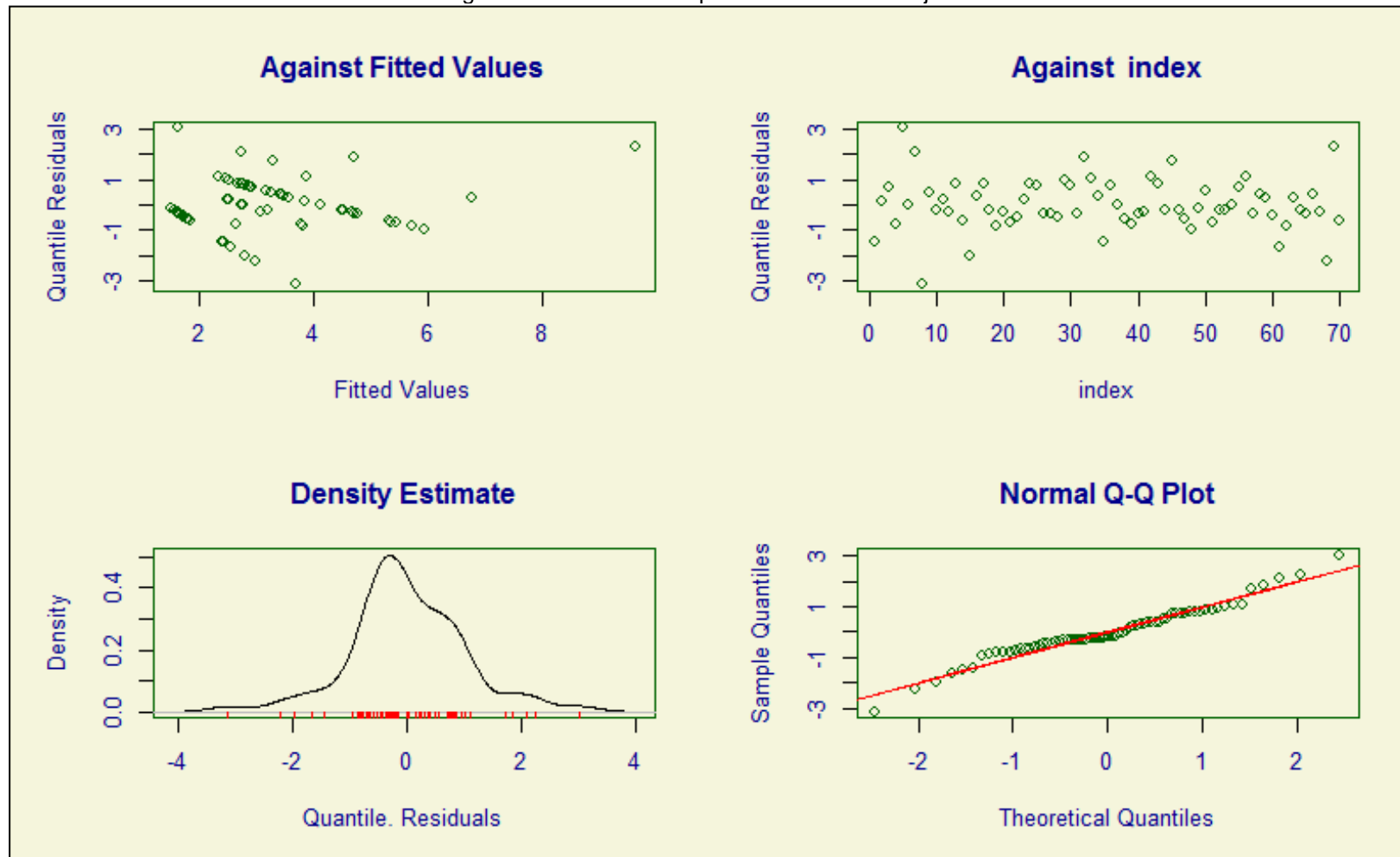
Fonte: autor

As variáveis com contribuição significativa foram o tipo de ambiente, nitrogênio amoniacal, DBO, COT e turbidez, o que não significa que as variáveis que ficaram fora do modelo não tenham associação com a atividade glicocorticogênica. Como o modelo é holístico, se uma variável está no modelo, o efeito dela é removido e então pesquisamos outra variável. Pode-se, então, ter variáveis associadas a essas que estão no modelo e que ficaram fora pois já havia no modelo uma outra que explicava a mesma coisa.

A última etapa do ajuste é a validação do modelo que consiste basicamente em verificar o comportamento dos resíduos (valores estimados – valores observados). Na Figura 29 estão apresentamos os gráficos utilizados para essa finalidade.

O teste de aderência mostrou que os resíduos se aderem a uma distribuição Gaussiana com média zero e desvio padrão igual a 1.

Figura 29 – Controle de qualidade do modelo ajustado usando GAMLSS



Fonte: autor

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho, de caráter exploratório, investigou a presença de glicocorticóides em rios e reservatórios do Estado de São Paulo por meio do bioensaio *GR-CALUX* e revelou a presença de atividade glicocorticogênica em 4 dos 19 pontos avaliados, com destaque para Rio Capivari e Ribeirão Pires que apresentaram resultados quantificáveis nas duas campanhas de 2019 no período de menores índices de chuvas, revelando a possível influência de diluição na concentração ambiental desses compostos conforme já indicado por outros autores e também para a elevada concentração observada no Ribeirão dos Meninos, local que recebe esgotos não tratados e também encontra-se logo a jusante do lançamento de uma grande ETE.

Foi observada correlação direta com os parâmetros nitrogênio amoniacal, nitrogênio *Kjeldahl*, fósforo, *E.Coli*, COT, DBO e atividade estrogênica e correlação inversa com os resultados para oxigênio dissolvido corroborando a ligação entre a presença dessa classe de fármacos com o lançamento de esgotos nos corpos d'água e o agrupamento dos locais estudados podem ser usados como base para escolha de futuros locais de amostragem e investigação da atividade glicocorticogênica.

Apesar dos resultados encontrados estarem na ordem de nanogramas por litro, ainda pouco se sabe sobre os efeitos crônicos para biota aquática e saúde humana, principalmente no que se refere a efeitos causados por misturas ambientais complexas.

É necessário investir na expansão dos conhecimentos científicos a respeito dos efeitos ecotoxicológicos causados por glicocorticoides em águas naturais com a finalidade de definição de valores orientadores e aprimoramento de índices de qualidade considerando a ocorrência de contaminantes emergentes nos diversos ambientes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos**. Carlos Jesus Brandão et al. (Org.). SÃO PAULO: CETESB, Brasília: ANA. 326p. 2011.

ALEXAKI, V.I.; HENNEICKE, H. ***The role of glucocorticoids in the Management of COVID-19***. *Horm. Metab. Res.*, v. 53, p. 9 – 15, 2021.

ALYGIZAKIS, N.A., BESSELINK, H., PAULUS, G.K., OSWALD, P., HORNSTRA, L.M., OSWALDOVA, M., MEDEMA, G., THOMAIDIS, N.S., BEHNISCH, P.A., SLOBODNIK, J. **Characterization of wastewater effluents in the Danube River Basin with chemical screening, in vitro bioassays and antibiotic resistant genes analysis**. *Environ. International*, v. 127, p. 420-429, 2019.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORK ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Method 5210 B: Biochemical Oxygen Demand**. In: _____ Standard methods for the examination of water and wastewater: Online. Washington, DC, 2017. Approved by SM Committee 2016. Disponível em: <<https://www.standardmethods.org/doi/pdf/10.2105/SMWW.2882.102>>. Acesso em: 18 Ago 2020.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORK ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Method 5310 B: Total Organic Carbon**. In: _____ Standard methods for the examination of water and wastewater: Online. Washington, DC, 2014. Approved by SM Committee 2016. Disponível em: <<https://www.standardmethods.org/doi/pdf/10.2105/SMWW.2882.104>>. Acesso em: 18 Ago 2020.

ARNOLD, K.E.; BROWN, A.R.; ANKLEY, G.T.; SUMPTER, J.P. ***Medicating the environment: assessing risks of pharmaceuticals to wildlife and ecosystems***. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. v. 369, p.1-11, 2014.

AUDIGIER, V.; HUSSON, F., JOSSE, J. **A Principal Components Method to Impute Missing Values for Mixed Data**. *Advances in Data Analysis and Classification*, v. 10, n.1, p. 5–26, 2016.

AUS DER BEEK T.; WEBER F.; BERGMAN S.; HICKMANN, S.; EBERT I.; HEIN A.; KUSTER A. ***Pharmaceuticals in the environment—Global occurrences and perspectives***. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 35, n. 4, p. 823–835, 2016.

BAUER, D.F. **Constructing confidence sets using rank statistics**. *Journal of the American Statistical Association*, v. 67, p. 687-690, 1972

BERGAMASCO, A.M.D.; ELDRIDGE, M.; SANSEVERINO, J.; SODRÉ, F.F.; MONTAGNER, C.C.; PESCARA, I.C.; JARDIM, W.F.; UMBUZEIRO, G.A.

Bioluminescent yeast estrogen assay (BLYES) as a sensitive tool to monitor surface and drinking water for estrogenicity. Journal of Environmental Monitoring, v.13, p. 3288-3293, 2013.

BERNHARDT, E.; ROSI, E.; GESSNER, M. **Synthetic chemicals as agents of global change.** Frontiers in Ecology and the Environment, v. 15/2, p. 84-90, 2017.

BILA, D.M.; DEZZOTI, M. **Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências.** Química Nova, v. 30, n. 3, p. 651 – 666, 2007.

BIODETECTION SYSTEMS (BDS). **Analyzing samples with U2-OS CALUX bioassays using sigmoidal dose response curves (with 0,1% or 1% DMSO).** versão D, 2013.

BIODETECTION SYSTEMS (BDS). **Assay Principle.**[s.d].Imagem. Disponível em: [http:// https://biodetectionsystems.com/products/bioassays/assay-principle/](http://https://biodetectionsystems.com/products/bioassays/assay-principle/). Acesso em: 14 jun. 2021.

BRAND, W.; 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, v. 55, p. 109 – 118, 2013.

BRASIL. **Lei n. 9.433**, de 8 de janeiro de 1997. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9433.htm>. Acesso em: 15 Jul. 2020.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Regional. Secretaria Nacional de Saneamento – SNS. **Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: 24º Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – 2018.** Brasília: SNS/MDR, 2019.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. CONAMA. **Resolução n° 430.** 13 de junho 2011. Diário Oficial da União, Brasília, 16 de junho de 2011.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. CONAMA. **Resolução n° 357.** 17 de março 2005. BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. CONAMA. Resolução n° 357. 18 de março de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância e Controle da qualidade da água para consumo humano.** Brasília: Ministério da Saúde, 2006

BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, E.L.G. **Limnologia fluvial: um estudo no Rio Mogi-Guaçu.** São Carlos:RIMA, 2003.

BOSCH-OREA, C.; FARRE, M.; BARCELO, M. **Biosensors and bioassays for environmental monitoring**. Comprehensive Analytical Chemistry, p. 337–383, 2017.

BOOVE, T.F.H.; HELSDIGER, R.J.R.; HAMERS, A.R.M.; BROWER, B.A., NIELEN, M.W.F. **Recombinant cell bioassays for the detection of (gluco)corticosteroids and endocrine-disrupting potencies of several environmental PCB contaminants**. Anal. Bioanal. Chem., v. 401, p. 873-882, 2011.

BRANCO, S.M.; ROCHA, A.A. **Poluição, proteção e usos múltiplos de represas**. São Paulo, CETESB, 1977.

BRAND, W.; 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**. Environ. International, v. 55, p. 109-118, 2013.

BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, E. L. G. **Limnologia Fluvial: um estudo no Rio Mogi-Guaçu**. São Carlos: Rima, 2009.

BU, H.; MENG, W.; ZHANG, Y.; WAN, J. **Relationships between land use patterns and water quality in the Taizi River basin, China**. Ecological Indicators, v. 41, p. 187-197, 2014.

BUCHWALD, P.; BODOR, N. **Soft glucocorticoid design: structural elements and physicochemical parameters**. Pharmazie, v. 59, p. 396-404, 2004.

BURNS, E.E.; CARTER, J.S.; THOMAS-OATES, J.; BOXAL, A.B.A. **Application of prioritization approaches to optimize environmental monitoring and testing pharmaceuticals**, Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, v. 21:3, p.115-141, 2018.

CALIMAN, F.A; GAVRILEUSCO, M., **Pharmaceutical, personal care products and endocrine disrupting agents in the enviromant – a review**. CLEAN – soil, air, water, v. 37, n-4-5, p. 277-303, 2009.

CAMPANHA, M.B.; AWAN, A.T.; DE SOUZA, D.N.; GROSSELI, G.M.; MOZETO, A.A.; FADINI, P.S. **A 3-year on occurrence of emerging contaminants in a urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil**. Environmental Science and Pollution Research, v. 22, n. 10, p. 7936 – 7947, 2015.

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, v.65, n.8, p.1265 – 1280, 2006.

CÉSPEDES, C.L.; TORRES, P.; MARÍN, J.C.; ARCINIEGAS, A.; DE VITAR, A.R.; PÉREZ-CASTORENA, A.L.; ARANDA, E. **Insect growth inhibition by**

trocotrienols and hydroquinones from Roldana barba-johannis, *Phytochemistry*, v. 65, n. 13, p. 1963 – 1975, 2004.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). **Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2016**. São Paulo: CETESB. Disponível em: <<https://aguasinteriores.cetesb.sp.gov.br/publicacoes-e-relatorios>> Acesso em: 16 Jan 2019.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). **Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2017**. São Paulo: CETESB. Disponível em: <<https://aguasinteriores.cetesb.sp.gov.br/publicacoes-e-relatorios>> Acesso em: 16 Jan 2019.

CHANG, H.; HU, J.; SHAO, B. **Ocurrence of Natural and Synthetic Glucocorticoids in Sewage Treatment Plants and Receiving River Waters**. *Environ. Sci. Technol.* v. 41, p. 3462-3468, 2007.

CHEN, Q.; JIA, A.; SNYDER, S.A.; GONG, Z.; LAM, S.H. **Glucocorticoid activity detected by in vivo zebrafish assay and in vitro glucocorticoid receptor bioassay at environment relevant concentrations**. *Chemosphere*, v. 144, p. 1162 – 1169, 2016.

COUTINHO, A.E.; CHAPMAN, K.E. **The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights**. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 335, p. 2-13, 2011.

CRISP, T.M.; CLEGG, E.D.; COOPER, R.L.; WOOD, W.P.; ANDERSON, D.G.; BAETCKE, K.P.; HOFFMANN, J.L.; MORROW, M.S.; RODIER, D.J.; SCHAEFFER, J.E.; TOUART, L.W.; ZEEMAN, M.G.; PATEL, Y.M. **Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis**. *Environ Health Perspect*, v.106 (Suplemento 1), p. 11-56, 1998.

CROGHAN, C.W.; EGEHY, P.P. **Methods of Dealing with Values Below the Limit of Detection using SAS**, US-EPA, Research Triangle Park, NC, 2003.

DANIELS, K.D.; VANDERVORT, D., WU, S.; LEUSCH, F.D.L.; VAN DER MERWE, J.P.; JIA, A.; SNYDER, S. **Downstream trends of in vitro bioassay responses in a wastewater effluent-dominated river**. *Chemosphere*, v. 212, p.181-192, 2018.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; BOUGUIGNON, J.; GIUDICE, L.C.; HAUSE, R.; PRINS, G.S.; SOTO, A.M.; ZOELLER, R. T.; GORE, A.C. **Endocrine-disrupting chemicals: An endocrine society scientific statement**, v.30, n.4, p.293-342, 2009.

ESCHER, B.I; AIT-AISSA, S.; BEHNISCH, P.A.; BRACK, W.; BRION, F.; BROUWER, A.; BUCHINGER, S.; CRAWFORD, S. E.; PASQUIER, D.; HAMERS, T.; HETTWER, K.; HILSCHEROVA, 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*, v. 628-629, p. 748 – 765, 2018.

DREVER, J. I. ***The Geochemistry of natural waters***. Editora Prentice Hall, 1988.

ESTEVEZ, F. A. **Fundamentos de limnologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Interciência, p.43-263, 1998.

EUGSTER, M.J.A.; SCHLESING, T. **Osmar: OpenStreetMap and R**. *The R Journal*, v.5, n. 1, p. 53-63, 2013.

FATTA-KASSINOS, D.; BESTER, K.; KUMMERER, K (Editores). ***Xenobiotics in the Urban Water Cycle: Mass Flows, Environmental Processes, Mitigation and Treatment Strategies***. *Environmental Pollution*, v. 16, 2010.

FELLOWS I. ***OpenStreetMap: Access to OpenStreetMap Raster Images***. *R package version 0.3.4., 2012. Disponível em <http://CRAN.R-project.org/package=OpenStreetMap>*.

GALILI, T.; O'CALLAGHAN, A.; SIDI, J.; SIEVERT, C. ***Heatmaply: an R package for creating interactive cluster heatmaps for online publishing***, *Bioinformatics*, v.34, n. 9, p. 1600 – 1602, 2018.

GASTALDINI, M. C.; MENDONÇA, A. S. **Conceitos para a avaliação da qualidade da água**. In: PAIVA, João Batista Dias de; PAIVA, Eloiza Maria Cauduro Dias de. (Orgs.) *Hidrologia Aplicada à Gestão de Pequenas Bacias Hidrográficas*. Porto Alegre. Associação Brasileira de Recursos Hídricos - ABRH, 2001.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. ***Interferentes Endócrinos no Ambiente***. *Quím. Nova*, v. 30, n- 3, p. 695-706, 2007.

GOKSØYR, A. ***Endocrine disruptors in the marine environment: mechanisms of toxicity and their influence on reproductive processes in fish***. *J. Toxicol. Environ. Health A.*, v. 69, n. 1-2, p. 175 – 84, 2006.

HALPENNY, C.M.; KOCAN, R. M.; WINTON, J. R.; PERRY, J. A.; HERSHBERGER, P. K. ***Elevated temperature exacerbates Ichthyophonus infections in buffalo sculpin***. *Fish Health Newsletter*. v. 30, n-2, p. 17-20, 2002.

HEBERER, T. ***Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data***. *Toxicology Letters*, v.131, p.5 – 17, 2002.

HIGINITE, C.; AZARNOFF, D. L. **Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent.** Life Sci. v. 20, p. 337, 1977.

HOLLANDER, M.; WOLFE, D.A. **Nonparametric Statistical Methods.** 1. Ed. New York: John Wiley & Sons, 1973.

HONAKER, J.; KING, G.; BLACKWELL, M. **Amelia II: A Program for Missing Data.** Journal of Statistical Software, v. 45, n. 7, p. 1–47, 2011.

HOUTMAN, C. J.; TEN BROEK, R.; BROUWER, A. **Steroid hormonal bioactivities, culprit natural and synthetic hormones and other emerging contaminants in waste water measured using bioassays and UPLC-tq-MS.** Science of Total Environment, v. 630, p. 1492 – 1501, 2018.

HOTHORN, T.; BRETZ, F.; WESTFALL, P. **Simultaneous Inference in General Parametric Models.** Biometrical Journal, v. 50 , n.3, p. 346—363, 2008.

HOTHORN, T.; BRETZ, F.; WESTFALL, P.; HEIBERGER, R.M. **Multcomp: Simultaneous Inference in General Parametric Models,** R package version 1.0-0, 2008. Disponível em <http://CRAN.R-project.org>.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Corodenação de População e Indicadores Sociais. **Pesquisa nacional de saneamento básico 2017: abastecimento de água e esgotamento sanitário.** Rio de Janeiro: 2020.

IPCS – International Programme on Chemical Safety. **Global Assessment of the state-of-the-science of endocrine interferents,** WHO – World Health Organization, 2002.

IPCS - International Programme on Chemical Safety. **Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors,** WHO – World Health Organization, 2012.

ISOBE, T.; SATO, K.; JOON-WOO, K.; TANABE, S.; SUZUKI, G.; NAKAYAMA, K. **Determination of natural and synthetic glucocorticoids in effluent of sewage treatment plants using ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** Environ. Sci. Pollut. Res., v. 22, p. 14127–14135, 2015.

JARDIM, W.; MONTAGNER, C.C.; PESCARA, I.C.; UMBUZEIRO, G.A.; BERGAMASCO, A.M.D.; ELDRIDGE, M.L.; SODRE, F.F. **An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water.** Separation and Purification Technology, v. 84, p. 3 – 8, 2012.

JIA, A.; ESCHER, B.I.; LEUSCH, F.D.L.; TANG, J.Y.M.; PROCHAZKA, E.; DONG, B.; SNYDER, E.M.; SNYDER, S.A. **In vitro bioassays to evaluate complex chemical mixtures in recycled water.** Water Research, v.80, p. 1 – 11, 2015.

JIA, Y.; HAMMERS-WIRTZ, M.; CRAWFORD, S.E.; CHEN, Q.; SEILER, T.; SCHAFFER, A.; HOLLERT, H. **Effect-based and chemical analyses of agonistic and antagonistic endocrine disruptors in multiple matrices of eutrophic freshwaters**. *Science of Total Environment*, v. 651, p. 1096 – 1104, 2019.

JOSSE, J.; HUSSON, F. **Journal of Statistical Software**, n.1, p. 1–31, 2016.

KANG, J. H.; LEE, S. W.; CHO, K. H.; KI, S. J.; CHA, S. M.; KIM, J. H. **Linking land-use type and stream water quality using spatial data of fecal indicator bacteria and heavy metals in the Yeongsan river basin**. *Water Research*, v. 44, p. 4.143-4.157, 2010.

KEITH, L.H. **Recent advances in the identification and analysis of organic pollutants in water**. *Life Sci*, v. 19, p. 1631, 1976.

KIERS, H.A.L. **Simple structure in Component Analysis Techniques for mixtures of qualitative and quantitative variables**. *Psychometrika*, v. 56, p. 197-212, 1991.

KONIG, M.; ESCHER, B.I.; NEALE, P.A.; KRAUSS, M.; HILSCHEROVA, K.; NOVAK, J.; TEODORO, I.; SCHULZE, T.; SEIDENSTICKERS, 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*, v. 220, p. 1220 – 1230, 2017.

KHETAN, S.; COLLINS, T. **Human pharmaceuticals in the aquatic environment: A challenge to green chemistry**. *Chemical Reviews*, v. 107/6, p. 2319-2364, 2007.

KUGATHAS, S.; WILLIAMS, R.J.; SUMPTER, J.P. **Prediction of environmental concentrations of glucocorticoids: The River Thames, UK, as an example**. *Environment International*, v.40, p. 15-23, 2012.

KUGATHAS, S.; SUMPTER, J.P. **Synthetic glucocorticoids in the environment: first results on their potential impact on fish**. *Environ. Sci. Technol.*, v. 45, p. 2377-2383, 2011.

KUSTER, A.; ADLER, N. **Pharmaceuticals in the environment: Scientific evidence of risks and its regulation**. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. v. 369, p.1-8, 2014.

LALONE, C.A.; VILLENEUVE, D.L.; OLMSTEAD, A.W.; MEDLOCK, E.K.; KAHL, M.D.; JENSEN, K.M.; DURHAN, E.J.; MAKYNEN, E.A.; BLANKSMA, C.A.; CAVALLIN, J.E.; THOMAS, L.M.; SEIDL, S.M.; SKOLNESS, S.Y.; WEHMAS, L.C.; JOHNSON, R.D.; ANKLEY, G.T. **Effects of a glucocorticoid receptor**

agonist, dexamethasone, on fathead mnow reproduction, growth, and development. *Environ. Toxicology and Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 611-622, 2012.

LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE).** São Carlos: Rima, 2004.

LEE, M.; SHEN, H.; HUANG, J.Z.; MARRON, J.S. **Biclustering via Sparse Singular Value Decomposition.** *Biometrics*, v. 66, p.1087–1095, 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*. v.99, p. 120 - 130, 2017.

LI, S.; GU, S.; TAN, X.; ZHANG, Q. **Water quality in the upper Han River basin, China: the impacts of land use/land cover in riparian buffer zone.** *Journal of Hazardous Materials*, v. 165, p. 317-324, 2009.

LIMA, E.B.N.R. **Modelagem integrada para gestão da qualidade da água na Bacia do Rio Cuiabá.** 2001. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

LIU, Y.; ZHANG, S.; JI, G.; WU, S.; GUO, R.; CHENG, J.; YAN, Z.; CHEN, J. **Occurrence, distribution and risk assessment of suspected endocrine-disrupting chemicals in surface water and suspended particulate matter of Yangtze River (Nanjing section).** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.135, p.90–97, 2017.

LOPES, V.R. **Avaliação da atividade estrogênica em esgotos sanitários e águas de reúso na região metropolitana de São Paulo.** 2016.100 p. Dissertação (Mestrado). Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo.

LORENZ, C.; OPITZ, R.; LUTZ, I.; KLOAS, W. **Corticosteroids disrupt amphibian metamorphosis by complex modes of action including increased prolactin expression.** *Comp. Biochem. Physiol. C.*, v.150, n. 2, p. 314-321, 2009.

MACÊDO, J.A.B. **Águas & águas.** São Paulo: Editora Varela, 2001.

MACÊDO, J.A.B. **Introdução à Química Ambiental: química & meio ambiente & sociedade.** 2ª Edição, 2006.

MACHADO, K. C., GRASSI, M.T., VIDAL, C., PESCARA, I.C., JARDIM, W.F., FERNANDES, A.N., SODRE, F.F., ALMEIRA, F.V., SANTANA, J.S., CANELA, M.C., NUNES, C.R.O., BICHINHO, K.M., SEVERO, F.J.R. **A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source Waters in Brazil.** *Science of Total Environment*, v. 572, p. 138 – 146, 2016.

MACIKOVA, P., GROH, K. J., AMMANN, A. A., SCHIRMER, K., SUTER, M. J. F. ***Endocrine Disrupting Compounds Affecting Corticosteroid Signaling Pathways in Czech and Swiss Waters: Potential Impact on Fish***. Environ. Sci. Technol. v. 48, n-21, p.12902-12911, 2014.

MADEIRA, S; OLIVEIRA, A. ***Biclustering Algorithm for Biological Data Analysis: A Survey***. IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics, v.1, p. 24–45, 2004.

MARGIOTTA-CASALUCI, L.; OWEN, S.F.; HUERTA, B.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; KUGATHAS, S.; BARCELÓ, D.; RAND-WEAVER, N.; SUMPTER, J.P. ***Internal exposure dynamics drive the adverse outcome pathways of synthetic glucocorticoids in fish***. Scientific Reports, v.6, n. 21978, 2016.

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.

MCNEIL, P.L.; NEBOT, C.; SLOMAN, K.A. ***Physiological and behavioral effects of exposure to environmentally relevant concentrations of prednisolone during zebrafish (Danio rerio) embryogenesis***. Environ. Sci. Technol., v. 50, n. 10, p. 5294-5304, 2016.

MEHINTO, A.C.; JAYASINGHE, B.S.; VANDERVORT, D.R.; DENSLOW, N.D.; MARUYA, K.A. ***Screening for Endocrine Activity in Water Using Commercially-available In Vitro Transactivation Bioassays***. Journal of Visualized Experiments, v.118, não paginado, 2016.

MELO, E.J.R. ***TRATAMENTO DE ESGOTO SANITÁRIO Avaliação da estação de tratamento de esgoto do Bairro Novo Horizonte na cidade de Araguari É MG***. Monografia. Programa de pós graduação lato sensu em Engenharia Sanitária, UNIMINAS, Uberlândia, 2007.

MENDES, B. ***Microbiologia da água***. In: Ferreira, W.F.C, Sousa, J.C.F. & Lima, N. (coords.). Microbiologia. Lidel-Edições técnicas, Ltda. Lisboa. 622 páginas. ISBN 978-972-757-515-2. 2010.

MESSIAS, T.G. ***Influência da toxicidade da água e do sedimento dos rios São Joaquim e Ribeirão Claro na bacia do Corumbataí***. 2008. 125 p. Dissertação (Mestrado). Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MONTAGER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. ***Contaminantes Emergentes em Matrizes Aquáticas do Brasil: Cenário Atual e Aspectos Analíticos, Ecotoxicológicos e Regulatórios***. Quim. Nova. v. 40, n- 9, p.1094-1110, 2017.

MULLARD, A. ***FDA drug approvals***. Nature Reviews Drug Discovery, v.18, p. 85-89, 2019.

- MURDOCH, D.J.; CHOW, E.D. ***A graphical display of large correlation matrices.*** *The American Statistician*, v.50, p. 178–180, 1996.
- NETTO, J. M. A. *et al.* **Sistemas de esgotos sanitários.** 2. Ed., São Paulo: CETESB, 1977.
- NGOYE, E.; MACHIWA, J. F. ***The influence of land use patterns in the Ruvu river watershed on water quality in the river system.*** *Physics and Chemistry of the Earth*, v. 29, p. 1.161-1.166, 2004.
- NOGUERA-OVIEDO, K.; AGA, D.S. ***Lessons learned from more than two decades of research on emerging contaminants in the environment.*** *Journal of Hazardous Materials*, v. 316, p. 242 – 251, 2016.
- OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. ***Pharmaceutical Residues in Freshwater: Hazards and Policy Responses.*** OECD Studies on Water, Editora OECD, 2019.
- OGA, S.; CAMARGO, M.M.A; BATISTUZZO, J.A.O. ***Fundamentos de Toxicologia.*** São Paulo, 3ª Edição, 2008, p.5.
- OLIVEIRA, I. F. ***Avaliação da Qualidade de Processos e Ferramentas de Participação na Gestão da Água.*** 2010. Dissertação (Mestrado). Universidade Nova Lisboa, Lisboa.
- OLIVEIRA, T.M.A. ***Análise de Fármacos e metilparabeno em amostras de água do Rio Itaperucu(MA), do Rio Mogi-Guaçu(SP) e do Rio Monjolinho e seus tributários(SP).*** 2017. Tese (Doutorado em Química Analítica). Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos.
- PAGÈS, J. ***Analyse Factorielle de Donnees Mixtes.*** *Revue Statistique Appliquee*, v.4, p. 93–111, 2004.
- PANNEKENS, H.; GOTTSCHLICH, A.; HOLLERT, H.; DOPP, E. ***Evaluation of mixture effects of endocrine active substances in wastewater using CALUX reporter-gene assays.*** *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v. 222, p. 670 – 677, 2019.
- PESCARA, I.C. ***Ocorrência e remoção de contaminantes emergentes por tratamentos convencionais de água e esgoto.*** 2014. 167 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- QUADRA, G. R.; OLIVEIRA, S. H.; COSTA, R.D.S; FERNANDEZ, M. A.D.S. ***Do pharmaceuticals reach and affect the aquatic ecosystems in Brazil? A critical review of current studies in a developing country.*** *Environ. Sci. Pollut. Res.*, v. 24, n.2, p. 1200-1218, 2016.
- QVERLI, Q.; KOTZIAN, S.; WINBERG, S. ***Effects of cortisol on aggression and locomotor activity in rainbow trout.*** *Horm. Behav.*, v. 42, p. 53-61, 2002.

RAIMUNDO C. C. M. **Contaminantes emergentes em água tratada e seus mananciais: sazonalidade, remoção e atividade estrogênica**. 2011. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2017. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.

REIS FILHO, R. W.; LUVIZOTTO-SANTOS, R.; VIEIRA, E. M. **Poluentes emergentes como desreguladores endócrinos**. Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology, v. 2, n. 3, p. 283-288, 2007.

ROCHA, G.C. **Avaliação da atividade estrogênica das águas do Rio Paraíba do Sul**. 2012. 189 p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RUNNALS, T.J.; MARGIOTTA-CASALUCI, L.; KUGATHAS, S.; SUMPTER, J.P. **Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: steroids and anti-steroids as high priorities for research**. Human and ecological risk assessment: an international journal, v.16:6, p. 1318-1338, 2010.

SANSEREVINO, J.; GUPTA, R. K.; LAYTON, A. C.; PATTERSON, S. S.; RIPP, S. A.; SAIDAK, L.; SAYLER, G. S. **Use of *Saccharomyces cerevisiae* BLYES Expressing Bacterial Bioluminescence for Rapid, Sensitive Detection of Estrogenic Compounds**. Applied and Environmental Microbiology, v. 71, n.8, p. 4455-4460, 2005.

SANSEVERINO, J.; ELDRIDGE, M.L.; LAYTON, A.C.; EASTER, J.P.; YARBROUGH, J.; SCHULTZ, T.W.; SAYLER, G.S. **Screening of potentially hormonally active chemicals using bioluminescent yeast bioreporters**. Toxicol. Sci., v.107,n.1, p. 122-134, 2009.

SCHRIKS, M.; VAN DER LINDEN, S. C.; STOKS, P. G. M.; VAN DER BURG, B.; PUIKKER, L.; VOOGT, P.; HERINGA, M. B. **Occurrence of glucocorticogenic activity in various surface water in the Netherlands**. Chemosphere, v. 93, p. 450-454, 2013.

SHEN, X.; CHANG, H.; SUN Y.; WAN Y. **Determination and occurrence of natural and synthetic glucocorticoids in surface water**. Environmental International, v. 134, p 1-11, 2020.

SILVA, G. H. **Sistema de alta eficiência para tratamento de esgoto residencial É estudo de caso na lagoa da conceição**. Monografia. Programa de graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

SILVA, A. L. **Interferentes endócrinos no meio ambiente: um estudo de caso em amostras de água *in natura* e efluente de estação de tratamento de esgotos na região metropolitana de São Paulo**. 2009. p. 201. Tese

(Doutorado). Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SODRÉ, F.; LOCATELLI, M.A.F.; MONTAGER, C.M.; JARDIM, W.F. **Origem e destino de interferentes endócrinos em águas naturais**. In: Caderno Temático Volume 6. Universidade Estadual de Campinas, 2007.

SOUZA, R. C. **Determinação de fármacos em mananciais do estado de São Paulo e estudo de sua ecotoxicidade sobre a cianobactéria *Myrocistis aeruginosa***. 2017. Tese (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo.

STACKELBERG, P. E.; GIBS, G.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; ZAUGG, S. D.; LIPPINCOTT, R. L. **Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal of pharmaceuticals and other organic compounds**. *Sci. Total Environ.*, v. 377, p. 255-272, 2007.

STAVREVA, D.; GEORGE, A.A.; KLAUSSMEYER, P.; VARTICOVSKI, L.; VOSS, T.C.; SCHILTZ, R.L.; BLAZER, V.S.; IWANOWICZ, L.R.; HAGER, G. **Prevalent Glucocorticoid and androgen activity in US water sources**. *Scientific Reports*, v. 2, n. 937, 2012.

STUMPF, M.; TERNESA, T.A.; WILKENA, R.D.; RODRIGUES, S.V.; BAUMANN W. **Poar drugs residues in sewage and natural Waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil**. *Science of the Total Environment*, v. 225, p.135-141, 1999.

SUMPTER J.P. **Endocrine Disrupter in the Aquatic Environment: An Overview**. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, v.33, n.1, p. 9-16, 2005.

TAHERAN, M.; NAGHDI, M.; BRAR, S.K.; VERMA, M.; SURAMPALLI, R.Y. **Emerging contaminants: Here today, there tomorrow!** *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, v. 10, p. 122 – 126, 2018.

TARAZONA, J.V.; MARTÍNEZ, M.; MARTÍNEZ, M.; ANADÓN, A. **Environmental impact assessment of COVID-19 therapeutic solutions. A prospective analyses**. *Science of the Total Environment*, v. 778:146257, 2021.

TELLES, D.D´A. (coordenador); GÓIS, J.S. (colaborador).Vários autores. **Ciclo ambiental da água: da chuva à gestão**. São Paulo: Blucher, 2013.

THRUPP, T.J.; RUNNALS, T.J.; SCHOLZE, M.; KUGATHAS, S.; KORTENKAMP, A.; SUMPTER, J.P. **The consequences of exposure to mixtures of chemicals: something from “nothing” and “a lot from a little” when fish are exposed to steroid hormones**. *Science of Total Environment*, v. 619-620, p. 1482-1492, 2018.

TOUSOVA, Z.; 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.; SCHOLLEE, J.E.; HOLLENDER, J.; SUTER, M.J.; HIDASE, A.O.; SCHIRMER, K.; SONAVANE, M.; AIT-AISSA, S.; CREUTOT, N.;

BRION, F.; FROMENT, H.; ALMEIDA, A.C.; THOMAS, K.; TOLLEFSEN, K.E.; TUFI, S.; 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, v. 601 – 602, p. 1849 – 1868, 2017.

TUNDISI, J.G.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; CIMINELLI, V.S.; BARBOSA, F.A.R. **Water availability, water quality water governance**. In: Cudennec, C. et al. (Eds). Hydrological Sciences and Water Security: Past, Present and Future, v. 366, p. 75-79, 2015.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Endocrine Disruptor Screening Program Universe of Chemicals**. Disponível em: <https://www.epa.gov/endo/pubs/edsp_chemical_universe_list11_12.pdf>. Acesso em: 19 Ago 2020.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An effects assessment and analysis**. Report Nº EPA/630/R-96/01229. 1997

USGS - United States Geological Survey, <<http://toxics.usgs.gov/regional/emc/index.html>>. Acesso em: 16 Jul 2020.

VAN DER LINDEN, S.C; HERINGA, M.B.; MAN, H.; 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**. Environ. Sci. Technol., v. 2008, p. 5814 – 5920, 2008.

VANZELA, L. S.; HERNANDEZ, F. B. T.; FRANCO, R. A. M. **Influência do uso e ocupação do solo nos recursos hídricos do córrego Três Barras, Marinópolis**. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. Campina Grande, v. 14, n. 1, p. 55-64, 2010.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. Volume 1. 3.ed. Belo Horizonte. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental: Universidade Federal de Minas Gerais, 2005

VON SPERLING, M. Estudos de modelagem da qualidade da água de rios. Belo Horizonte: UFMG, 2007.

WANG, J. **Computational Perspective for Developing Bioluminescent Yeast Estrogen Screens for Environmental Toxicology**. PhD diss., University of Tennessee, 2016. Disponível em: <https://trace.tennessee.edu/utk_graddiss/3670>. Acesso em: 25 Jun 2020.

WANG, C.; SHI, H.; ADAMS, C. D.; GAMAGEDARA, S.; STAYTON, I.; TIMMONS, T.; MA, Y. **Investigation of pharmaceuticals in Missouri natural and drinking water using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry**. *Water Res.*, v. 45, n. 4, p. 1818-1828, 2011.

WATER QUALITY ASSOCIATION – WQA, Contaminants of Emergin Concern, disponível em: <<https://www.wqg.org/whats-in-your-water/emergin-contaminants>>. Acesso em: 25 Set 2019.

WEBER, F.; AUS DER BEEK, T.; BERGMAN, A.; CARIUS, A.; GRUTTNER, G.; HICKMANN, S.; EBERT, I.; HEIN, A.; KUSTER, A.; ROSE, J.; KOCH-JUGL, J.; STOLZENBERG, H. **Pharmaceuticals in the environment - The global perspective: Occurrence, effects, and potential cooperative action under SAICM**, German Federal Environmental Agency, 2014.

WALKER, B.S.; JANNEY, J.C. **Strogenic substances.II. Analysis of plant sources**. *Endocrinology*, v. 14, p. 389 – 392, 1930.

WEIZEL, A.; SCHLUESENER, M. P.; DIERKES, G.; TERNES, T. A. **Occurrence of Glucocorticoids, Mineralocorticoids and Progestogens in Various Treated Wastewater, Rivers and Streams**. *Environ. Sci. Technol.*, v. 52, p. 5296 – 5307, 2018.

WHO. **Pharmaceuticals in drinking-water**. 2012

WIECZERZAK M.; NAMIESNIK, J.; KUDLAK, B. **Bioassays as one of the Green Chemistry tools for assessing environmental quality: a review**. *Environment International*, v. 94, p. 341-361, 2016.

WILKINSON, G.N.; ROGERS, C.E. **Symbolic descriptions of factorial models for analysis of variance**. *Applied Statistics*, v.22, p. 392—399, 1973.

WILLI, R.A.; SALGUEIRO-GONZALEZ, N.; FAKTERMANN, S.; HETTICH, T.; FENT, K. **Environmental glucocorticoids corticosterone, betamethasone and flumethasone induce more potent physiological than transcriptional effects in zebrafish embryos**. *Science of the Total Environment*, v. 672, p. 183-191, 2019.

WILLI, R.A.; FALTERMANN, S.; HETTICH, T.; FENT, K. **Active glucocorticoids have a range of important adverse developmental and physiological effects on developing zebrafish embryos**. *Environmental Sci. Technology*, v.52, n. 2, p. 877-885, 2018.

WOLI, K. P.; NAGUMO, T.; KURAMOCHI, K.; HATANO, R. **Evaluating river water quality through land use analysis and N budget approaches in livestock farming areas**. *Sciences of the Total Environment*, v. 329, p. 61-74, 2004.

8 APÊNDICES

APÊNDICE A – Dados Transformados incluindo dados estimados (em vermelho)

Ponto	Data de Coleta	AG	AE	DBO	COT	logEcoli	pH	Temp.	OD	Fósforo	NKT	N. Amoniacal	Nitrato	Nitrito	Turb.	ST
Córrego Rico	Oct-20	1,6	0,44	2	5	2,9031	7,29	22,5	5,81	0,1	0,639	0,11	1,94	0,07	14	71
Res. Cascata	Sep-20	1,6	3,57	6	8	1,2788	8,5	25,9	11,5	0,01	1,16	0,35	0,34	0,03	16	71
Res. Cascata	Jul-20	1,6	0,07	5	6,7	1,2041	9,5	21,1	12,9	0,02	1,35	0,05	0,14	0,01	8,1	235
Res. Das Graças	Nov-19	1,6	0,07	3	4,2	1,7076	6,8	25,5	8,06	0,02	0,86	0,1	0,1	0,1	8,5	58
Res. Das Graças	Sep-19	1,6	0,07	2	3,3	1,8261	6,72	17,9	8,3	0,02	0,35	0,1	0,25	0,1	24,2	326
Res. Das Graças	Jul-19	1,6	0,07	2	4,03	1,30100	5,75	16,50	8,19	0,01	0,75	0,1	0,1	0,1	3,76	71
Res. Das Graças	May-19	1,6	0,07	2	4,7	1,5563	6,21	21	6,43	0,01	0,399	0,3	0,1	0,07	13,3	208
Res. Das Graças	Mar-19	1,6	0,07	4	8,5	1,9823	5,98	22,1	6,35	0,05	0,897	0,1	0,1	0,07	22	274
Res. Das Graças	Jan-19	1,6	0,07	3	9,00	1,94939	6,61	28,90	7,76	0,01	1,190	0,1	0,1	0,1	15,80	71
Res. Das Graças	Nov-18	1,6	0,07	3	8,2	2,0934	6,18	23,8	7,61	0,04	0,68	0,1	0,1	0,07	70	246
Res. Das Graças	Oct-18	1,6	0,07	2,00	6,73	2,24	6,77 0	24,27	7,10	0,030	0,76	0,1	0,1	0,1	22,50	187,0 0
Res. Das Graças	Jul-18	1,6	0,07	2	4,12	1,17	6,34	21,10	8,59	0,020	0,720	0,1	0,1	0,1	8,55	71
Res. Edgard de Souza	Oct-20	4,6	20,4	28,11	23	6,1761	7,6	25,2	0,15	2	26,8	18,5	0,1	0,01	24	196
Res. Guarapiranga	Nov-18	1,6	0,07	5	6,7	2,3424	8,68	22,9	9,81	0,13	2,02	0,1	0,94	0,07	3,9	71
Res. Guarapiranga	Jul-18	15,6	0,07	3	5,3	1	8,03	20,6	10,57	2,48	1,60	0,1	0,59	0,13	5	170
Res. Taiapuêba	Nov-18	1,6	0,07	2	5	1,3979	6,95	26,5	7,24	0,05	0,61	0,1	0,1	0,07	10	71
Res. Taiapuêba	Sep-18	1,6	0,07	2	3,9	0,6021	7,24	20,7	7,54	0,01	0,65	0,1	0,1	0,07	2,44	71
Res. Taiapuêba	Jul-18	1,6	0,07	2	4,61	0,95	7,14	18,5	7,93	0,03	0,780	0,1	0,1	0,1	8,85	71,00
Ribeirão do Sertãozinho	Oct-20	4,6	0,89	19	28,9	5,5798	7,21	24,7	2,64	2	10,1	5,4	0,85	0,16	27	166
Ribeirão dos Meninos	Apr-20	44	7,68	6,425	31,2	6,505	7,4	22,1	0,65	2	15,7	10,6	3,96	0,8	33	306
Ribeirão Pires	Oct-20	4,6	4,49	14,19	13,7	5,6532	6,9	20,3	2,18	0,8	9,71	5,19	0,1	0,08	13	222

Ponto	Data de Coleta	AG	AE	DBO	COT	logEcoli	pH	Temp.	OD	Fósforo	NKT	N. Amoniacal	Nitrato	Nitrito	Turb.	ST
Ribeirão Pires	Nov-19	4,6	8,6	7,91	9,2	5,5563	7	22	2,16	0,87	11,8	9,9	0,1	0,1	30	152
Ribeirão Pires	Sep-19	4,6	6,3	16	4,7	5,3802	7,06	24	1,25	2,64	11,1	10,6	0,1	0,1	16	71
Ribeirão Pires	Jul-19	9,9	17,4	13	11,2	4,6628	6,95	16,6	0,58	0,52	7,22	6,46	0,1	0,07	122	212
Ribeirão Pires	May-19	7,6	9,91	9	10,6	5,3979	6,87	22,2	1,18	0,42	8,22	7,4	0,1	0,07	4,64	71
Ribeirão Pires	Mar-19	3,1	4,63	6	8,3	4,8633	6,84	24,7	0,59	0,28	4,624	0,26	0,21	0,07	3,76	71
Ribeirão Pires	Jan-19	4,6	8,19	10	9,5	5,301	6,22	28	1,52	0,8	8,94	6,39	0,1	0,07	12,9	172
Ribeirão Pires	Nov-18	4,6	6,48	4	13	4,716	7,08	21,9	1,71	0,74	9,03	8,2	0,1	0,07	19,3	200
Ribeirão Pires	Jul-18	1,6	8,59	14	9,1	5,3424	7,53	19,1	3,8	1,44	11,02	9,59	0,1	0,07	12	156
Ribeirão Preto	Oct-20	8,7	1,64	5	23,4	4,5051	7,42	24,5	5,72	1	9,91	8,4	1,73	1,06	27	214
Rio Araras	Dec-19	4,6	1,26	17	8,3	5,3979	6,7	24,4	4,92	0,6	3	1	0,1	0,1	5	398
Rio Araras	Oct-19	4,6	0,07	148	81,6	6,3222	7,4	22,5	0,54	2,01	16,5	5,64	0,1	0,18	6,2	138
Rio Araras	Aug-19	4,6	2,55	48	41,1	5,9138	7,13	19,4	1,78	2	10,1	7,68	0,1	0,01	55	275
Rio Araras	Jun-19	4,6	0,46	9	7,7	5,2304	6,81	19	3,76	0,3	3,16	1,93	0,46	0,08	8	328
Rio Araras	Apr-19	1,6	0,07	5	11,3	3,7853	6,82	23,5	3,43	0,14	1,83	1,25	0,12	0,04	1160	2250
Rio Araras	Feb-19	4,6	1,21	6	6,2	2,8865	6,13	25	2,16	0,2	3	3	0,1	0,01	5,63	71
Rio Araras	Dec-18	4,6	6,78	26	9,2	5,3802	7,13	24,8	1,07	0,7	6	5	0,1	0,07	24,6	71
Rio Araras	Oct-18	3,1	5,28	39	20,6	6,1461	7,21	23,8	0,75	1	7	0,7	0,1	0,01	6,8	132
Rio Araras	Aug-18	4,6	2,31	32	10,6	5,7782	6,71	18,1	0,61	1	11	8	0,1	0,01	13	210
Rio Araras	Jun-18	4,6	1,68	45	18,8	6,301	7,16	18,4	3,73	1	9	8	0,1	0,02	5,4	319
Rio Atibaia	Nov-18	4,6	0,07	3	6,9	3,8692	7,33	24,4	6,64	0,2	1	0,7	1	0,09	13	136
Rio Atibaia	Sep-18	1,6	0,2	5	6,6	3,9912	7,2	22	6,2	0,4	3	2	2	0,2	15,4	500
Rio Atibaia	Jul-18	3,1	0,52	3	4,1	2,9085	7,2	20	6,3	0,6	3	3	4	0,5	5	170
Rio Capivari	Oct-20	4,6	0,32	9,45	9,8	2,5911	7,35	22,2	1,87	0,7	15	13	3	0,5	40	138
Rio Capivari	Dec-19	4,6	0,07	7	8,8	3,6902	7,35	24,2	6,42	0,4	3	2	1	0,3	40	115
Rio Capivari	Oct-19	4,6	0,41	4	8,4	2,4518	7,51	24,8	3,95	0,5	15	15	3	0,6	22,1	484
Rio Capivari	Aug-19	1,6	0,32	180	74,9	3,4771	6,8	14	1,96	5	8,73	3,2	2	0,2	52	113
Rio Capivari	Jun-19	3,3	0,92	2	8,1	3,8921	7,32	16,6	7,79	0,2	2,89	2,52	2,06	0,33	8,72	162
Rio Capivari	Apr-19	2,2	0,21	1	5,2	3,0645	7,89	22,3	7,08	0,15	0,498	0,29	2,73	0,4	9,87	158
Rio Capivari	Feb-19	1,6	0,23	8	5,2	3	7,58	26,6	6,06	0,6	2	0,8	2	0,4	15,7	192
Rio Capivari	Dec-18	4,6	0,07	4	7,8	3,7404	7,41	23	6,94	0,3	1	0,7	1	0,2	15,8	71

Ponto	Data de Coleta	AG	AE	DBO	COT	logEcoli	pH	Temp.	OD	Fósforo	NKT	N. Amoniacal	Nitrato	Nitrito	Turb.	ST
Rio Capivari	Oct-18	3,1	0,97	5	6,7	2,4472	7,64	23,5	5,94	0,3	4	4	2	0,4	4,6	71
Rio Capivari	Aug-18	11	0,64	5	5,7	2,5051	7,4	17	6,3	0,4	2	2	2	0,3	1,89	71
Rio Capivari	Jun-18	1,6	0,11	8	5,1	2,301	7,4	17,7	6,7	0,4	3	1	3,87	0,43	11	226
Rio Cotia	Sep-18	4,6	14,9	20	19	5,4914	7,5	23,1	6,68	1,28	9,39	15,1	0,1	0,07	199	434
Rio Cotia	Jul-18	4,6	2,96	11,21	10,85	3,86746	7,71 9	26,20	6,01	1,21	4,81	4,518	1,472	1,218	28,89	386,8 7
Rio Jundiá	Dec-18	15,6	1,52	26	16,4	4,3802	7,57	26	4,12	1	15	14	1	0,9	26	234
Rio Jundiá	Oct-18	3,1	0,55	20	19,7	5,2041	7,23	22,3	4,6	1	5	4	2	0,2	20	218
Rio Jundiá	Aug-18	4,6	1,04	15	16,7	4,2553	7,2	23	5,6	2	12	12	7	1	4,7	294
Rio Jundiá	Jun-18	4,6	1,05	19	14,6	4,8513	7,2	22,7	2,2	1	10	8	4,57	0,47	13	342
Rio Piracicaba	Oct-20	4,6	0,33	11,72	11,6	3,6532	7,4	26,7	4,1	0,5	5	5	0,51	0,37	20	210
Rio Piracicaba	Aug-20	4,6	0,8	12,24	12	5,415	6,5	21,2	1,8	0,8	5	5	0,08	0,18	20	212
Rio Piracicaba	Nov-18	4,6	0,66	6	8,3	3,9243	6,9	24,6	3,9	0,3	2	2	0,22	0,22	65	202
Rio Piracicaba	Sep-18	4,6	0,77	7	9,8	4,0414	7,2	21,5	3,6	1	6	5	0,04	0,11	13	194
Rio Piracicaba	Jul-18	3,1	0,07	7	10,7	3,5315	6,9	18,7	3,9	0,9	7	6	0,04	0,12	3,3	71
Rio Pirapora	Nov-20	1,6	0,07	3	7,4	3,6335	6,98	19,6	2,3	0,26	3,05	2,17	1,92	0,29	26,8	446
Rio Tietê	Oct-20	4,6	10,4	25,63	21,4	5,7076	7,1	24,2	1,45	0,9	13,3	9,86	0,1	0,01	16	154
Rio Tietê	Nov-18	4,6	0,07	2	6	1,7482	6,52	22,6	3,55	0,06	0,63	0,1	0,1	0,07	98	446
Rio Tietê	Sep-18	4,6	0,07	2	6	1,6628	6,6	18,9	4,74	0,06	0,590	0,1	0,1	0,07	2,44	71
Rio Tietê	Jul-18	3,1	0,07	5	5,74	2,11	6,53	15,70	5,51	0,070	1,000	0,1	0,4	0,1	3,90	71,00

Fonte: autor

APÊNDICE B – Resultados da modelagem GAMLSS

GAMLSS Results

 Family: c("GG", "generalised Gamma Lopatatsidis-Green")

Call: gamlss(formula = GR_CALUX ~ Ambiente - 1 + Ni.Amoniacal +
 DBO + COT + Turbidez, family = GG, data = na.omit(df))

Fitting method: RS()

 Mu link function: log

Mu Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)	
Ambiente Lântico	0.3426069	0.1131429	3.028	0.003584	**
Ambiente Lótico	0.7975094	0.1304599	6.113	7.16e-08	***
Ni Amoniacal	0.0437709	0.0119054	3.677	0.000496	***
DBO	-0.0168659	0.0049925	-3.378	0.001265	**
COT	0.0362888	0.0112159	3.235	0.001950	**
Turbidez	-0.0005960	0.0001671	-3.567	0.000702	***

 Signif. codes: '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1

 Sigma link function: log

Sigma Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)	
(Intercept)	-0.9235	0.1049	-8.805	1.61e-12	***

 Signif. codes: '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1

 Nu link function: identity

Nu Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)	
(Intercept)	-2.0402	0.8055	-2.533	0.0139	*

 Signif. codes: '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1

 No. of observations in the fit: 70

Degrees of Freedom for the fit: 8

Residual Deg. of Freedom: 62

at cycle: 14

Global Deviance: 256.5898

AIC: 272.5898

SBC: 290.5777

```
*****  
          Summary of the Quantile Residuals  
              mean    = -0.004632008  
              variance =  1.017756  
      coef. of skewness =  0.06560172  
      coef. of kurtosis =  4.366518  
Filliben correlation coefficient =  0.9787646  
*****
```

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, Inovações e Comunicações.
