

# Disruptores endócrinos: um problema de Saúde Pública e Animal

Ana Paula Gomes Fonseca

Artigo integrado na  
**Parte 3 "Domínio das Ciências da Saúde"**  
da publicação.

**Páginas do artigo**  
113 a 145

**Título da Publicação**  
Ciências Aplicadas: Coletânea de Estudos

**Coordenação**  
Susana Gonçalves, Helena Almeida, Paula Fonseca, Cândida Malça,  
Fátima Neves, Carlos Dias Pereira e Marco Veloso

**Data de publicação**  
Fevereiro de 2017

**Editor**  
CINEP/IPC

**ISBN (impresso)** 978-989-99463-0-9

**ISBN(ebook)** 978-989-99463-1-6

## Nota biográfica

Ana Paula Gomes **Fonseca**

Ana Paula Fonseca é doutorada em Ciências da Saúde|Ciências Biomédicas pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, tendo obtido o grau de mestre em Mestre em Métodos Instrumentais e Controlo de Qualidade Analítica pela Faculdade de Química da Universidade de Aveiro, licenciada em Farmácia pela Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, licenciada em Geologia pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra e detentora do Título de Especialista em Farmácia. Atualmente é professora Adjunta no Departamento de Farmácia da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, coordenadora do Grupo de Investigação Aplicada em Farmácia, coordenadora do Mestrado em Farmácia|Especialização em Farmacoterapia Aplicada da ESTESC, investigadora na Unidade de I&D Química-Física Molecular | Universidade de Coimbra e Presidente do Conselho Pedagógico. Depois de adquirir competências na área da Farmácia e nos Métodos Instrumentais de Análise decorrente de toda a formação académica, os seus interesses atuais de investigação estão focados na área da Farmácia, nomeadamente na monitorização de fármacos, no meio ambiente, em estudos de efetividade de medicamentos e no estudo de sistemas biológicos e farmacologicamente relevantes. Autora de diversos artigos científicos em revistas internacionais indexadas, diversas participações em congressos nacionais e internacionais da área e diversas publicações em atas científicas, é também orientadora de alunos do 1º, 2º e 3º ciclo.



## **Disruptores endócrinos: um problema de Saúde Pública e Animal**

Ana Paula Gomes Fonseca

Atualmente, um dos estudos mais relevantes e expressivos no âmbito da saúde pública, centra-se na presença de micropoluentes no meio ambiente, em concentrações bastante preocupantes. Alguns destes compostos podem produzir efeitos tóxicos na saúde humana e animal, devido à sua presença em águas superficiais e subterrâneas, mesmo que seja em concentrações muito baixas (na ordem dos  $\text{ng L}^{-1}$ ).

Fármacos, disruptores endócrinos (DE) e poluentes orgânicos persistentes, têm sido dos compostos mais pesquisados devido aos seus efeitos nocivos a vários níveis. Os disruptores endócrinos, são suspeitos de causarem efeitos adversos no sistema endócrino de humanos e animais aliado à sua resistência à biodegradação e persistência no meio ambiente causando fenómenos de biomagnificação na cadeia alimentar (Bila *et al.*, 2007; Campani, 2010).

De entre estas classes de compostos, a mais preocupante tem sido ligada aos DE, já que a literatura descreve efeitos na reprodução de peixes e outros animais, indução de características femininas em peixes machos, redução da quantidade de esperma e aumento da incidência de alguns tipos de cancro no Homem.

Doenças como cancro da mama, útero e próstata, desenvolvimento sexual anormal, redução de fertilidade masculina, aumento da incidência de ovários policísticos, alteração de glândulas (tiróide), distúrbios na função dos ovários (crescimento folicular e ovulação), fecundação e consequentemente gravidez, entre o aumento de outras doenças, que ainda não se encontram devidamente sustentadas por estudos (Coleman *et al.*, 2005).

Dentro deste conjunto de efeitos adversos, a disrupção endócrina influencia o desenvolvimento, crescimento, reprodução e mesmo o comportamento dos humanos e animais, podendo danificar e alterar diretamente um órgão endócrino, interagir com um recetor de hormonas e/ou alterar o metabolismo de hormonas no sistema endócrino (Bila *et al.*, 2007; Campani, 2010).

As substâncias que possuem capacidade de afetar o sistema endócrino nos humanos e animais, quando expostos a estas, são várias, nomeadamente compostos sintéticos como o 17 $\alpha$ - etinilestradiol (EE2), pesticidas, bisfenol A, entre outros, e compostos naturais como a estrona (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2), estriol (E3) e fitoestrogénios.

Os estrogénios, principalmente o E2 e EE2, têm sido classificados como sendo os maiores responsáveis pela disrupção endócrina, possuindo um alto potencial estrogénico, sendo excretados diariamente por humanos e animais.

As hormonas esteróides são um grupo de compostos biologicamente ativos, sintetizados a partir do colesterol e que apresentam em comum um anel ciclopentano-o-perhidrofenantereno. Os esteróides naturais são excretados pelo córtex adrenal, testículos, ovários e placenta nos humanos e nos animais e inclui progestogénios, glucocorticóides, mineralocorticóides, androgénios e estrogénios.

Os estrogénios naturais são, predominantemente, hormonas femininas e vitais para a manutenção da homeostase dos tecidos reprodutivos, seios, pele e cérebro. Os estrogénios sintéticos, como o EE2, são utilizados como contraceptivos, aplicados em terapia de reposição hormonal, bem como em doenças hormonais (Ying *et al.*, 2002; Wise *et al.*, 2011).

Nos humanos e nos mamíferos, os estrogénios sofrem várias transformações, principalmente, a nível hepático. São, frequentemente, oxidados, hidrolisados e metilados antes da conjugação final com ácido glucorónico ou sulfato. Por exemplo, o E2 é rapidamente oxidado em E1 que pode ser convertida em E3, o principal produto de excreção. Muitos outros metabolitos polares, como o



16-hidroxi-estrona, 16-cetoestrona ou 16-epiestriol, são formados a partir do E2 e podem estar presentes na urina e nas fezes.

Os estrogénios são excretados maioritariamente na forma de conjugados polares inativos. O EE2 é eliminado principalmente na forma conjugada, no entanto, outras transformações metabólicas de menor relevância poderão ocorrer. A questão que se levanta é se estes conjugados dos estrogénios naturais e sintéticos, endocrinamente inativos, podem ser convertidos nas formas ativas no meio ambiente ou nas estações de tratamento de águas residuais (ETARs), aumentando a sua concentração ambiental. Esta hipótese é suportada pela deteção de vários estrogénios na forma não conjugada, como o E2, a E1, o 16 $\alpha$ -hidroxiestrona e o EE2, em efluentes de ETARs em concentrações superiores às que seria de esperar com base nas concentrações das formas excretadas (Ternes *et al.*, 1999; Ying *et al.*, 2002; Bila *et al.*, 2007).

Johnson et al em 2000 procederam ao levantamento e cálculo da excreção de compostos estrogénicos pelos humanos, estimando a excreção diária de estrogénios para homens e mulheres. A excreção através da urina para os homens foi estimada em cerca de 1.6  $\mu\text{g}/\text{dia}$  de E2, 3.9  $\mu\text{g}/\text{dia}$  de E1 e 1.5  $\mu\text{g}/\text{dia}$  de E3. Para as mulheres menarcas foi calculada uma excreção de 3.5  $\mu\text{g}/\text{dia}$  de E2, 8  $\mu\text{g}/\text{dia}$  de E1 e 4.8  $\mu\text{g}/\text{dia}$  de estriol (E3). Para mulheres na menopausa foi calculada uma excreção de 2.3  $\mu\text{g}/\text{dia}$  de E2, 4  $\mu\text{g}/\text{dia}$  de E1 e 1  $\mu\text{g}/\text{dia}$  de E3; na gravidez foram estimadas excreções de 259  $\mu\text{g}/\text{dia}$  de E2, 600  $\mu\text{g}/\text{dia}$  de E1 e 6000  $\mu\text{g}/\text{dia}$  de E3.

A quantidade excretada de EE2, quando usado como contraceptivo oral pelas mulheres, foi estimada em 35  $\mu\text{g}/\text{dia}$ . Baseado nesta excreção diária de estrogénios pelos humanos e no fator de diluição, é esperado existirem no ambiente aquático níveis de estrogénios na ordem dos  $\mu\text{g}\text{-ng L}^{-1}$  (Ying *et al.*, 2002).

As hormonas esteróides têm sido detetadas em águas residuais, superficiais, subterrâneas, bem como em solos, sedimentos e alimentos, etc. O comportamento e o destino destas hormonas esteróides no ambiente

dependem das suas propriedades físico-químicas, bem como das características do meio ambiente.

Os estrogénios naturais têm maior solubilidade que os esteróides sintéticos. Estudos indicam que todos eles têm uma adsorção moderada aos sedimentos e baixo tempo de semi-vida nos solos e nas águas, sofrendo ambos uma rápida transformação nas ETARs. A taxa de remoção nas ETARs está dependente da conceção da própria ETAR e da quantidade de dejetos (Ying *et al.*, 2002).

Uma característica importante, entre outras, para o estudo destes compostos é a sua hidrofobicidade e hidrofobicidade, já que estas regulam os processos de absorção e distribuição de DE, sendo necessário que se dissolvam e atravessem as membranas biológicas até alcançarem os respetivos locais de ação (Fatta *et al.*, 2007).

Os efluentes das ETARs são uma complexa mistura de poluentes que poderão apresentar propriedades ou capacidade de provocar disrupção endócrina. A exposição dos seres vivos a estes efluentes, poderá traduzir-se em efeitos negativos a nível individual e, possivelmente, ao nível das populações (Solé *et al.*, 2002).

Assim, a monitorização de estrogénios sintéticos (EE2) e naturais (E1, E2, E3) no meio ambiente tem vindo a ganhar grande interesse, especialmente pelo facto de, frequentemente serem detetados nas ETARs, águas para consumo humano, rios, lagos, solos, alimentos, etc., (Desbrow *et al.*, 1998; Ternes *et al.*, 1999; Solé *et al.*, 2002; Ying *et al.*, 2002; Park, *et al.*, 2004).

De entre as hormonas estrogénicas, os estrogénios com maior interesse e habitualmente pesquisados no ambiente aquático são o E1, o E2, o E3 e o EE2, devido ao seu potencial como disruptores endócrinos (Larsson *et al.*, 1999; Örn *et al.*, 2003).

A crescente necessidade em conhecer os potenciais impactos da ação de compostos disruptores endócrinos em seres aquáticos, nomeadamente em peixes, conduziu a uma busca urgente de ensaios fiáveis, para a avaliação do



efeito de um determinado composto isoladamente, bem como de misturas complexas, como é o caso dos efluentes domésticos e industriais (Larsson *et al.*, 1999; Örn *et al.*, 2003, Versonnen *et al.*, 2004).

Apesar de ser conhecido o efeito estrogénico de muitos compostos químicos, residem dúvidas sobre se as concentrações em que eles se encontram no meio ambiente são suficientes para causar efeitos fisiológicos adversos nos indivíduos ou populações expostas vs tempo de exposição. Com o intuito de avaliar o risco da exposição, são inúmeros os estudos desenvolvidos nesta área, sendo evidente que a existência de substâncias estrogénicas no meio ambiente é um problema de saúde pública, animal e ambiental global em efluentes de ETARs municipais e hospitalares (Kolpin *et al.*, 2002).

No desenvolvimento deste trabalho de investigação pretendeu-se utilizar metodologias, normalmente utilizadas na análise qualitativa e quantitativa (Skoog, Nieman, & Holler, 5ª edição, 2002), nomeadamente cromatografia líquida de alta resolução (CLAE) com deteção UV, na identificação e quantificação de estrogénios em efluentes com potencial atividade estrogénica, e ainda a quantificação em afluentes de nove ETARS da região central de Portugal, por forma a averiguar a eficiência dos tratamentos de águas residuais. Para tal as amostras recolhidas necessitaram de uma pré-concentração, antes da sua análise, recorrendo-se à técnica de extração em fase sólida (EFS).

Pretendeu-se igualmente fazer estudos de termoestabilidade e fotodegradação dos estrogénios alvos, sob condições de controlo de diversos fatores, tais como: temperatura e radiação solar, utilizando também a espectroscopia UV-visível (UV-Vis), como forma de comparar e reforçar os resultados obtidos por Eletroforese Capilar (EC).

Segundo a bibliografia consultada, a maior parte dos estudos existentes têm sido realizados principalmente em diversas espécies de peixes, pelo que também faz parte integrante deste trabalho de investigação, a quantificação de estrogénios em anfíbios macho (*Rana/Pelophylax perezi*). Estes animais têm pele permeável, vivem na água e no solo, e devido à sua fisiologia e seu ciclo de

vida são expostos a determinadas variações ambientais, sendo particularmente sensíveis à poluição química dos sistemas aquáticos, considerada hoje em dia, uma das possíveis causas para a crescente extinção destes animais.

## **Determinação dos estrogénios alvo nas ETARS estudadas.**

### **Material e métodos**

Foi utilizado um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência da Dionex, equipado com quatro bombas P680, injetor automático ASI-100 e detetor de ultravioleta PDA-100. Na separação dos compostos foi usada uma coluna analítica de fase reversa C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm, Restek Pinnacle, DB), com um fluxo de 0,8 mL min<sup>-1</sup> em condições isocráticas. A fase móvel consistiu numa mistura de acetonitrilo/água (45:55, v/v), e a quantidade de amostra injetada de 20 µL, sendo o comprimento de onda de deteção escolhido de 200 nm.

A solução-padrão mãe (0,2500 g L<sup>-1</sup>) composta por estrona (Sigma, 99%), 17 β-estradiol (Fluka, 97%), estriol (Sigma, 99%) e 17α-etinilestradiol (Sigma, 98%) foi preparada em acetonitrilo (Panreac Química, SA). A partir desta solução mãe, foram preparadas seis soluções-padrão com concentrações no intervalo entre 0,05-10,00 mg L<sup>-1</sup> em água ultra-pura e efetuadas as respetivas retas de calibração.

Após a sua preparação, todas as soluções foram desgaseificadas utilizando um banho de ultrassons, durante 15 minutos. Posteriormente todas as soluções foram filtradas através de um filtro de membrana de 0,22 µm, antes da análise por CLAE.

### **Preparação das amostras recolhidas nas ETARs**

Foram recolhidas e analisadas amostras de efluentes de várias ETARs com



tratamentos secundários, na região centro de Portugal, nomeadamente nas regiões do Baixo Vouga (Aveiro), Baixo Mondego (Coimbra) e Pinhal Litoral (Leiria). No distrito de Aveiro procedeu-se à recolha e análise de amostras da ETAR de Cacia (Aveiro), ETAR de Aguada de Cima (Águeda) e ETAR da Mealhada. No Concelho de Coimbra procedeu-se à recolha e análise de amostras da ETAR do Choupal (Coimbra), ETAR de Taveiro (Coimbra), ETAR de Ceira (Coimbra) e ETAR de Alagoa (Arganil). No Concelho de Leiria procedeu-se à recolha e análise de amostras da ETAR de Pombal e ETAR da Marinha Grande. Todas as amostras de água foram recolhidas três vezes, por períodos temporais diferentes (uma recolha por mês), à entrada e saída de nove ETARs principais localizadas na Região Centro de Portugal, recebendo apenas águas domésticas.

Após a recolha das águas, todas as amostras foram filtradas através de um filtro de microfibras de vidro GF/F 55 MM da Whatman com a ajuda de uma bomba de vácuo, para eliminação dos sólidos em suspensão. Foi sucessivamente filtrada através de um filtro de fibra de vidro de 0,45 µm da Millipore, antes da sua extração em fase sólida (EFS). Após este procedimento, todas as amostras foram acidificadas a pH 2 e armazenadas a 4 °C ao abrigo da luz. O procedimento experimental de EFS utilizado para as amostras foi sempre realizado 24 h após a recolha, para minimizar a possível atividade microbiana. Após o procedimento de EFS, o produto de eluição foi seco, recorrendo a uma bomba de vácuo, sendo o extrato redissolvido em 1 mL de acetonitrilo. Após esta reconcentração e antes da sua análise por CLAE, as amostras foram filtradas através de um filtro de membrana de 0,22 µm da Millipore.

### **Análise das amostras à entrada e saída das ETARs**

De referir que os valores de LOD obtidos, na otimização deste método, foram de 0,45 mg L<sup>-1</sup> para o E3, 0,24 mg L<sup>-1</sup> para o E2, 0,11 mg L<sup>-1</sup> para o EE2 e 0,089 mg L<sup>-1</sup> para a E1 (Miiller&Miller, 2005.XVI). Os coeficientes de correlação (R<sup>2</sup>) das retas de calibração de cada estrogénio, foram sempre

superiores a 0,999.

Na generalidade as concentrações dos estrogénios encontradas à entrada das ETARS estudadas, variaram em intervalos de 0,14-0,51  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o estradiol, 0,13-0,23  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o etinilestradiol e 0,16-0,72  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a estrona (Tab 1 e 2). As concentrações dos estrogénios encontradas à saída das mesmas variaram em intervalos de 0,10-0,20  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o estradiol, 0,11 a 0,19  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o etinilestradiol e 0,15-0,25  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a estrona (Tabela 1 e 2). De salientar, que embora o estriol apresentasse um pico em todos os cromatogramas, a área obtida resultou sempre num valor mais baixo que o LOD calculado na respetiva curva de calibração. De sublinhar ainda que para este composto, por vezes ocorreram algumas dificuldades na utilização do processo EFS-CLAE, nomeadamente na obtenção de resultados reprodutíveis para as baixas concentrações encontradas, mesmo para um número de réplicas igual a cinco.

Tabela 1. *Concentrações dos estrogénios alvo, expressas em  $\mu\text{g L}^{-1}$  ( $n=3$ ), à entrada e saída das nove ETARS estudadas (entre 3000 e 6000 habitantes)*

Concentração dos estrogénios ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	ETAR 1 Jan-Mar		ETAR 8 Jan-Mar		ETAR 9 Jun-Ago		ETAR 3 Fev-Abr		ETAR 6 Fev-Abr	
	Número de habitantes servidos por cada ETAR									
	3 000		3 000		3 145		5 000		6 000	
	Ent <sup>a</sup>	Sai <sup>b</sup>	Ent <sup>a</sup>	Sai <sup>b</sup>	Ent <sup>a</sup>	Sai <sup>b</sup>	Ent <sup>a</sup>	Sai <sup>b</sup>	Ent <sup>a</sup>	Sai <sup>b</sup>
E1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,23	0,16	0,16	0,15
DP	-	-	-	-	-	-	±0,02	±0,01	±0,04	±0,02
E2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,25	0,19
DP	-	-	-	-	-	-	-	-	±0,02	±0,03
E3	0,24	0,15	n.d.	0,15	n.d.	n.d.	0,25	n.d.	0,16	n.d.
DP	±0,01	±0,02	-	±0,02	-	-	±0,03	-	±0,04	-
EE2	0,13	0,14	n.d.	0,14	n.d.	n.d.	0,16	n.d.	0,19	n.d.
DP	±0,01	±0,03	-	±0,03	-	-	±0,02	-	±0,02	-

<sup>a</sup>entrada da ETAR

<sup>b</sup>saída da ETAR

DP= desvio padrão

n.d. = não detetado



Tabela 2. Concentrações dos estrogénios alvo, expressas em  $\mu\text{g L}^{-1}$  ( $n=3$ ), à entrada e saída das nove ETARS estudadas (entre 20 500 e 203 202 habitantes)

Concentração dos estrogénios ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	ETAR Jan-Mar		ETAR 5 Jan-Mar		ETAR 2 Jun-Ago		ETAR 4 Fev-Abr	
	Número de habitantes servidos por cada ETAR							
	20 500		50 000		180 000		203 202	
	Ent <sup>a</sup>	Sai <sup>b</sup>	Ent <sup>a</sup>	Sai <sup>b</sup>	Ent <sup>a</sup>	Sai <sup>b</sup>	Ent <sup>a</sup>	Sai <sup>b</sup>
E1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,72	0,25
DP	-	-	-	-	-	-	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$
E2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,14	0,10
DP	-	-	-	-	-	-	$\pm 0,03$	$\pm 0,01$
E3	0,15	n.d.	0,14	n.d.	0,24	0,12	n.d.	n.d.
DP	$\pm 0,02$	-	$\pm 0,01$	-	0,02	0,02	-	-
EE2	0,14	n.d.	0,18	n.d.	0,15	0,12	0,14	n.d.
DP	$\pm 0,03$	-	$\pm 0,02$	-	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$	$\pm 0,06$	-

<sup>a</sup>entrada da ETAR      <sup>b</sup>saída da ETAR      DP= desvio padrão      n.d. = não detetado

Nota: as concentrações do E3 determinadas estão abaixo do valor de LOD pelo que deverão ser lidas como indicativas somente da presença desta hormona.

## Resultados e discussão

Os estrogénios mais frequentemente detetados à entrada de todas as ETARs estudadas foram o E3 (abaixo do LOD) e EE2 (Graf. 1a), mas à saída a concentração mais elevada encontrada foi a de E1 (Figura 1a). Todos os estrogénios naturais e sintéticos foram detetados à entrada das ETARs que servem um número de habitantes entre 5 000 e 203 202. A sua presença à entrada destas ETARs pode ser explicada como sendo consequência natural da excreção humana.

A presença de EE2 nos efluentes é de particular interesse uma vez que há estudos que mencionam a sua toxicidade a baixas concentrações e na ordem dos nanogramas por litro (Johnson & Sumpter, 2001). O E1 e E2 (Figura. 1b e 1c) são os estrogénios mais frequentemente encontrados à saída das ETARs estudadas, particularmente nas que servem maior número de habitantes.

Assim, a ocorrência de E1, E2 e EE2 à saída das ETARs, poderá ser o resultado de uma remoção incompleta destes compostos durante o tratamento, ou a libertação de formas conjugadas ativas destas hormonas, durante o processo de tratamento (Alda & Barceló, 2001; Jonhson et al, 2000).

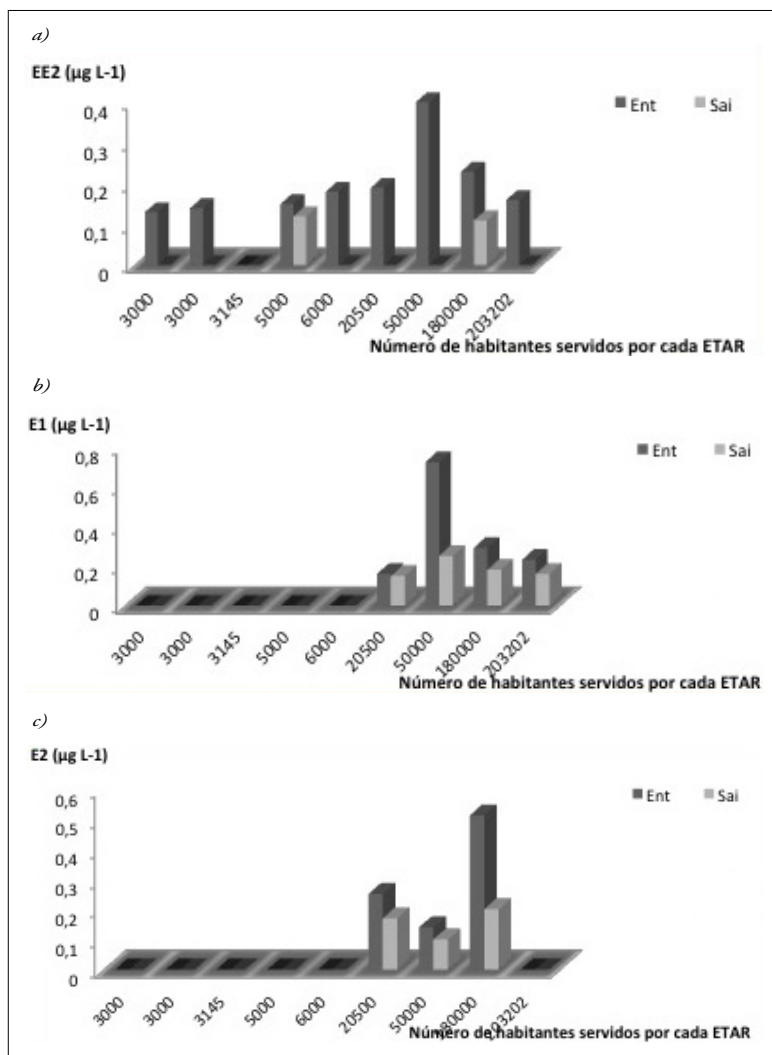


Figura 1. Estrogénios vs entradas e saídas das diferentes ETARs estudadas (n=3); a)-etinilestradiol; b)- estrona; c)- estradiol

## Conclusão

As ETARs, por norma, não são concebidas para ter em atenção o tratamento de contaminantes orgânicos, o aparecimento de compostos emergentes, na forma de sub-produtos e seus metabolitos, que persistem após o tratamento das águas residuais, entrando desta forma no ambiente aquático, e posteriormente nas estações de tratamento de água (ETAs) que servem os habitantes. Os três estrogénios naturais, bem como o estrogénio sintético têm sido frequentemente detetadas em descargas de ETARs, devido à sua incompleta remoção durante o tratamento das águas residuais (Yan *et al*, 2009; Sarmah *et al*, 2006; Vulliet *et al*, 2007; Laganá *et al*, 2004).

Neste estudo, foi efetuada uma otimização dos métodos analíticos com base num procedimento experimental EFS-CLAE com deteção UV, para a determinação simultânea dos quatro estrogénios alvo em amostras de água residuais.

Inicialmente cinco métodos diferentes de SPE (descritos no capítulo III) foram testados, com padrões, para a otimização do procedimento a aplicar na quantificação dos estrogénios alvo em amostras reais. Para o método escolhido, efetuaram-se testes de recuperação para cada estrogénio, com resultados muito bons que variam entre 100-120% para a E1, 85 a 110% para o E2, 90 a 120% para o EE2 e 89,8 a 110% para o E3.

Estes resultados confirmaram que o método EFS-CLAE utilizado foi considerado adequado para a aplicação em amostras de águas residuais das diferentes ETARS escolhidas, tendo sido utilizado o mesmo procedimento experimental, em todas as determinações das concentrações dos quatro estrogénios na entrada e saída das mesmas.

Todos os compostos que foram escolhidos para este estudo foram detetados nos afluentes e efluentes das nove ETARS, com concentrações na casa dos nanogramas por litro, indicando uma permanente entrada nos rios, após o tratamento destas águas residuais.



Na generalidade, as concentrações dos estrogénios encontradas à entrada das ETARS estudadas, variaram em intervalos de 0,14-0,51  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o estradiol, 0,13-0,23  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o etinilestradiol e 0,16-0,72  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a estrona. As concentrações dos estrogénios encontradas à saída das mesmas variaram em intervalos de 0,10-0,20  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o estradiol, 0,11 a 0,19  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o etinilestradiol e 0,15-0,25  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a estrona.

As quantidades que eventualmente possam ser ingeridas potenciam a hipótese de bioacumulação nos organismos aquáticos e respetivos efeitos ambientais destes compostos, aparentemente estáveis e biologicamente ativos. Relativamente a este estrogénio, uma possível contribuição para as concentrações de etinilestradiol observadas poderá surgir da parcial conversão de outros princípios ativos constituintes dos contraceptivos orais (ex. noretisterona) e/ou tratamentos hormonais (Solé *et al.*, 2002).

Estes resultados são semelhantes quando comparados aos valores obtidos em estudos efetuados em outros países, como a Alemanha, Itália e Holanda (Jonhson *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2008; Streck, 2009).

Os resultados mostram ainda que os estrogénios pesquisados, podem ser simultaneamente separados e, posteriormente, quantificados usando o método escolhido, em amostras de águas residuais, com uma precisão bastante satisfatória.

## **Estudo da degradação dos estrogénios**

### **Material e métodos**

Todas as medições UV-Vis foram realizadas utilizando um Espectrofotómetro Shimadzu UV-1603, e células de quartzo com um percurso ótico de 1 cm.

Todas as análises por eletroforese capilar foram efetuadas, utilizando um sistema Beckman P/ACE MDQ equipado com um detetor de matriz de

díodos. As separações electroforéticas foram realizadas utilizando um capilar de sílica fundida não revestido, com comprimento total de 50 cm (40 cm de comprimento até á janela ótica), diâmetro interno de 50  $\mu\text{m}$  e diâmetro externo de 375  $\mu\text{m}$ .

### **Preparação das amostras para medição UV\_Vis e análise por eletroforese capilar**

As soluções-padrão de E1, E2, E3 e EE2 utilizadas em UV-Vis foram todas preparadas individualmente, num volume apropriado de metanol e com uma concentração de 2 g L<sup>-1</sup>. Foram feitas diluições de cada solução stock em água com metanol a 5%, obtendo-se uma concentração final de 0,1 g L<sup>-1</sup>.

O eletrólito de separação utilizado em EC foi preparado diariamente, de forma a conter 10 mM de borato de sódio (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>) e ácido cólico 100 mM (C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>O<sub>5</sub>Na.H<sub>2</sub>O), ambos da Sigma Aldrich, em água ultra pura, e com um pH final de 9,2. O tempo de utilização do eletrólito foi limitado a 2 dias, uma vez que após esse tempo, as suas características ficavam alteradas, afetando assim o poder separativo do método. A solução-padrão mãe, com a concentração de 2 g L<sup>-1</sup> de estrona (Sigma, 99%), 17 $\beta$ -estradiol (Fluka, 97%), estriol (Sigma, 99%) e 17 $\alpha$ -etinilestradiol (Sigma, 98%) foi preparada em metanol (Panreac Química, SA). A partir desta solução mãe, foram preparadas seis soluções-padrão com concentrações no intervalo entre 1,5-50,0 mg L<sup>-1</sup> em solução eletrolítica. Após a sua preparação, todas as soluções foram desgaseificadas utilizando um banho de ultra-sons, durante 15 minutos.

O acondicionamento de um capilar novo foi efetuado da seguinte forma: lavagem com NaOH 1 M, durante 10 min, seguida de uma lavagem com NaOH 0,1 M, durante 30 min, lavagem com água ultra pura, durante 5 min e, por último, uma lavagem com eletrólito, durante 10 min. No entanto, para além do acondicionamento do capilar novo, foram efetuadas lavagens quer no início e final do dia, quer entre análises. As lavagens diárias consistiram em lavagens com NaOH 1 M, NaOH 0,1 M, água e eletrólito, durante 2

min cada, enquanto entre análises, apenas se procedeu à lavagem com NaOH 0,1 M, durante 5 min, água ultra pura, durante 2 min, e eletrólito durante 3 min. Todas as lavagens foram efetuadas à pressão de 20 psi e todas as soluções utilizadas foram filtradas, usando um filtro 0,22  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro, antes de cada análise.

## Resultados e discussão

### Análise da degradação por espectroscopia UV-Visível

O traçado do espectro individual de cada estrogénio por UV-Vis foi efetuada antes da sua análise por EC, e assim verificar a respetiva degradação ao fim de 7, 14, 21, 28, 35, 63, 91 e 126 dias. O efeito da temperatura foi avaliado em condições de 4° C (frigorífico), 20° C (temperatura ambiente) e 30° C (banho-maria), bem como ao abrigo da luz. Para estudar o efeito da irradiância solar direta foram utilizados tubos de quartzo com as soluções amostra e expostas diretamente à radiação (GPS 40°N 11.885; 8°W 27.650) durante os 126 dias de estudo. O valor de irradiância média foi de 5,4 KWh/m<sup>2</sup>/dia (Huld e Suri), representado na figura 2.

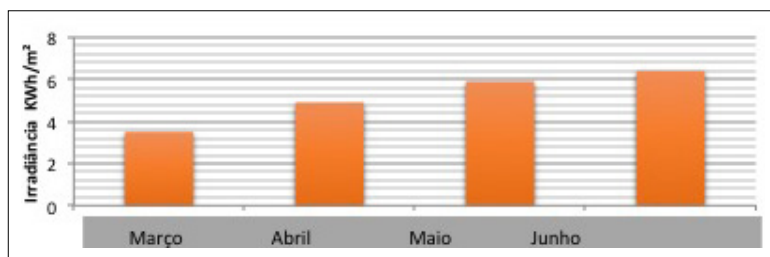


Figura 2. Valores da irradiância média de cada mês durante o estudo experimental.

Os espectros das diferentes amostras foram todos obtidos entre o intervalo 210 e 300 nm. Os quatro estrogénios mostraram espectros de UV-Vis muito similares apresentando dois picos: um primeiro ao comprimento de onda de



226 nm e um segundo ao comprimento de onda de 281 nm.

Durante todo o estudo experimental, não se observaram alterações significativas nos espectros das amostras que se encontravam ao abrigo da luz e que se encontravam nas condições de temperatura de 4°, 20° e 30°C. Contudo, verificou-se fotodegradação nas amostras que estiveram expostas à radiação solar ao longo dos 126 dias, como nos mostra a figura 3. Comparando as formas dos espectros no dia 0 (início) e no dia 126 (fim), podem-se observar alterações significativas, indicando degradação dos compostos estudados.

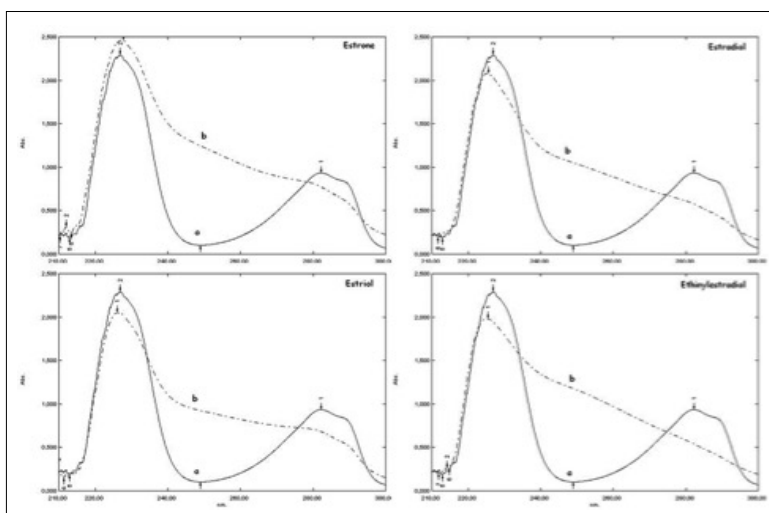


Figura 3. Sobreposição dos espectros, de cada estrogénio, sobre condições de radiação solar directa

### Análise da degradação por electroforese capilar de zona

Através da análise dos electroferogramas (Figura 4), pode verificar-se a diminuição das áreas do pico correspondentes a cada estrogénio, ao mesmo tempo que outros picos foram surgindo (assinalados a vermelho), resultantes da degradação dos estrogénios e formação de fotoprodutos

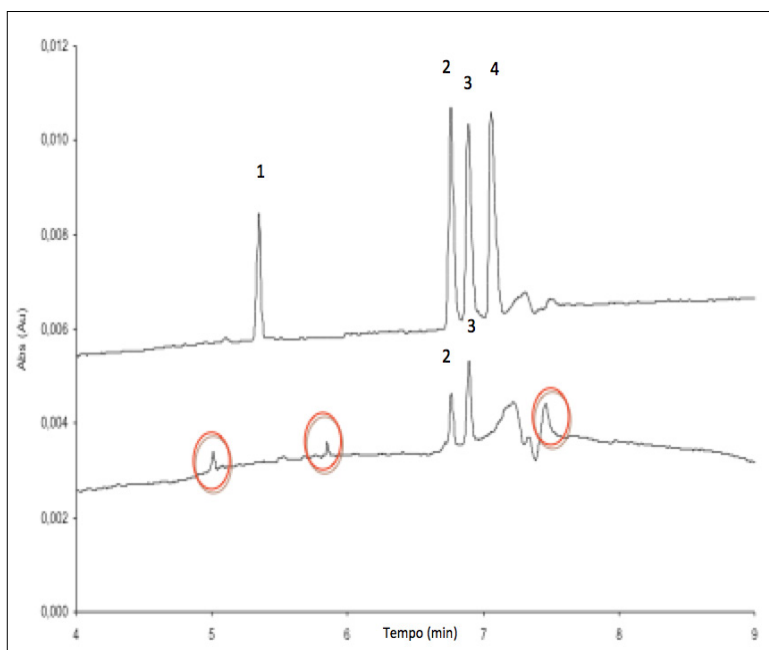


Figura 4. Electroferograma da amostra ao tempo zero (a); depois de 126 dias sob efeito direto da radiação solar (b). Identificação de cada pico: (1) - E3; (2)- E2; (3) -EE2 (4) E1 – Estrona 0 - picos não identificados (subprodutos?)

Analisando a figura 5 é possível observar que não existe degradação significativa para nenhum dos estrogénios estudados, às temperaturas de 4°, 20° e 30° C e ao abrigo da luz. Por outro lado, sob o efeito da radiação solar direta, a estrona apresenta 100% de degradação após 120 dias de estudo. De todos os estrogénios alvo deste estudo, o EE2 parece ser o estrogénio mais persistente de todos, com cerca de 20% da concentração inicial, após 120 dias de estudo. O estriol apresentou a maior taxa de degradação no início do estudo, apresentando 50% de degradação após 40 dias. Para a estrona apresentar 50% de degradação foram necessários 55 dias, enquanto para o E2 foram 60 dias e para o EE2 75 dias. De salientar ainda, que a taxa de degradação do estriol tornou-se muito lenta após 80 dias de estudo. Pelos resultados obtidos neste estudo, relativamente à degradação destes compostos sob várias condições, é evidente e claro o efeito positivo da radiação solar direta na degradação e eliminação

destes disruptores endócrinos, mesmo em concentrações tão elevadas como as que foram utilizadas neste estudo. Portanto, a luz solar direta nas estações de tratamento de águas residuais, pode aumentar a remoção de alguns destes disruptores, através do processo de fotodegradação.

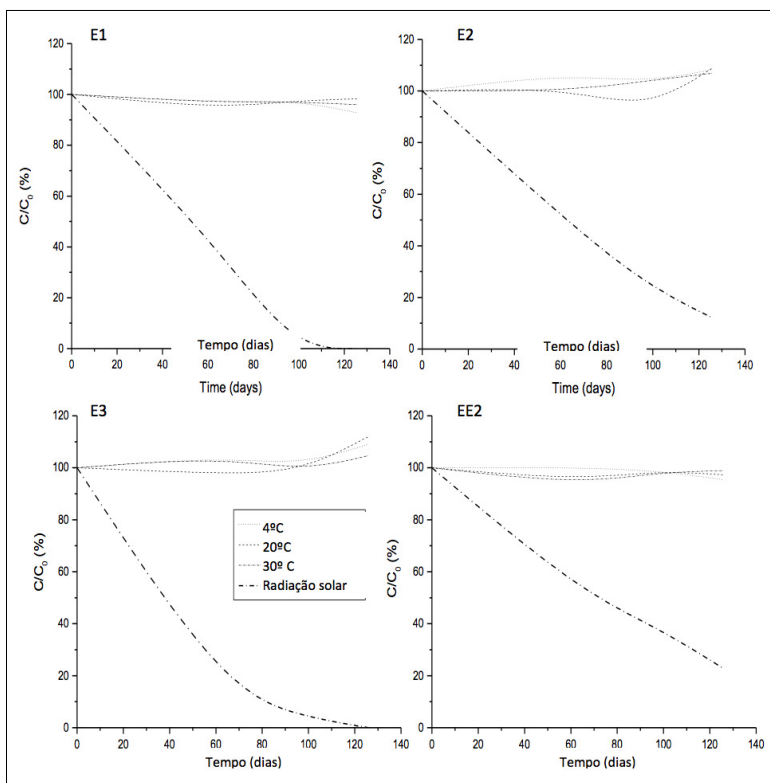


Figura 5. Variação da concentração(%) de cada estrogénio, em função do tempo.

## Conclusão

O presente estudo demonstrou que o E1, E2, E3 e EE2 no intervalo de temperaturas de 4°C e 30°C, ao abrigo da luz, não sofrem degradação detetável com os métodos analíticos utilizados neste trabalho. No entanto, sob radiação solar direta observou-se uma mudança nas formas dos espectros obtidos, após

126 dias, para todos os estrogénios estudados. A análise feita por electroforese capilar mostrou que sob a radiação solar direta, a estrona apresentou 100% de degradação após 126 dias. O EE2 foi o único que pareceu ser mais persistente e o E3 foi o que apresentou uma taxa de degradação inicial mais rápida.

Outra observação que poderá ser feita, através da análise dos electroferogramas, é o aparecimento de vários picos correspondendo à formação de sub-produtos derivados da degradação dos estrogénios. Este estudo demonstra que E1, E2, E3 e EE2 podem ser degradados por radiação solar natural e direta, no entanto, outras condições ambientais, tais como: presença de matéria orgânica natural, atividade biológica e variação do teor de oxigénio, devem ser estudadas de modo a poder tirar conclusões mais próximas das que se tirariam tendo em atenção as condições naturais (Fonseca *et al.*, 2010).

## **Uso de Radioimunoensaio na determinação de estrogénios em anfíbios nos efluentes das ETARS**

### **Material e métodos**

Para todas as análises efetuadas, foi utilizado um contador Gamma da Siemens Medical Solutions Diagnostics, uma centrífuga refrigerada da JP Selecta, incubadora da marca Selecta, agitador Vortex da marca Selecta e micropipetas manuais da marca Eppendorf.

Para a determinação do estradiol, foi utilizado um Kit de Estradiol Duplo 125I radioimunoensaio (PIKE2D-6), fornecido pela Siemens Medical Solutions Diagnostics contendo os seguintes reagentes: anti-corpo estradiol liofilizado (E2D1, 5E2D1); estradiol sintético iodado 125I (E2D2), sete padrões de estradiol (E2D3-9), com concentrações de 0, 5, 10, 20, 50, 150 e 500 pg mL<sup>-1</sup> em soro humano processado equivalente a 0, 0,02, 0,04, 0,07, 0,18, 0,55 e 1,84 nM L<sup>-1</sup> e uma solução precipitante (N6, 5N6) que consiste em gama globulina de cabra anti-coelho.

Para a determinação da estrona foi utilizado um Kit de Estrone-RIA-CT (KIP19100) de uso diagnóstico in vitro, fornecido pela DIAsource ImmunoAssays S.A., contendo os seguintes reagentes: estrona marcada com  $^{125}\text{I}$  estabilizada numa solução tampão, conservante de  $\text{NaN}_3$  ( $< 0,1\%$ ); seis padrões de estrona, com concentrações de 0, 12,5, 25, 50, 125, 250, 750  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; solução controle contendo soro humano e uma solução de lavagem concentrada (70 vezes).

As curvas de calibração foram obtidas usando diferentes concentrações de padrões de antigénio, tendo os valores experimentais calculados através da equação 1, função logística de 4 parâmetros (4PL) (Dudley *et al*, 1985)

$$y = [(A - D) / [1 + (x / C)^B]] + D \quad \text{Equação 1}$$

onde:

y = valor do sinal

x = concentração de antigénio;

A = concentração do padrão zero

B = declive no ponto de inflexão

C = valor de concentração no ponto de inflexão

D = concentração do padrão em excesso

No entanto, a fim de comparar várias curvas padrão, os valores foram normalizados entre 100% (A) e 0% (D), que de acordo com a razão (Schneider *et al*, 2005):

$$Y_N = (Y - D)/(A - D) * 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde  $Y_N$  é a resposta normalizada, A e D são parâmetros da equação 4PL (Schneider *et al.*, 2005), podendo ainda ser expressa pela seguinte razão:

$$\% \text{ B/B0} \quad \text{Equação 3}$$

onde:

B- concentração do padrão zero (D)

B0 - concentração do padrão em excesso (A)

## Locais de amostragem

Foram escolhidos seis locais para o estudo, em quatro pontos da Região Centro de Portugal, dois grupos de controlo e quatro grupos-alvo em rios (efluentes das ETARS acima referidas). Os quatro grupos-alvo estão localizados no rio Mondego (Grupo I), com as coordenadas GPS 40 ° N 11,885; 8 W ° 27,650, Rio Vouga (Grupo II) com as coordenadas GPS 40 N ° 11,885; 8 W ° 27,650, Rio Cértima (Grupo III) com as coordenadas GPS (40 N ° 11,885, 27,650 W 8 °) e Rio Arunca (Grupo IV) com as coordenadas GPS (39 N ° 56,062, 8 ° W 38,202). Estes quatro locais situam-se nas saídas das ETARs, onde as águas residuais depois de tratadas são lançadas nos respetivos rios.

Os dois grupos de controlo (Grupo Controlo I e Grupo de Controlo II) localizados em Coimbra, um numa fonte doméstica e outro numa fonte municipal, com as coordenadas GPS 40 ° N 11,885; 8 W ° 27,650 e 40 ° N 11,885; 8 W ° 27,650, respetivamente, onde havia a certeza que as águas não tinham qualquer razão para conterem quaisquer tipos de contaminantes e, os indivíduos não estiveram expostos a concentrações elevadas dos compostos em estudo.

## Amostragem

Para o estudo em causa, recolheram-se amostras de sangue de indivíduos de rã-verde *Rana/Pelophylax perezi*. Tratando-se de uma espécie protegida por convenções internacionais (Convenção de Berna) e legislação nacional e comunitárias específicas (Anexo V da “Directiva Habitats” Decreto-Lei 140/99 de 24 de Abril, retificado pela Declaração de Retificação n.º 10-AH/99, de 31 de Maio, alterado pelo Decreto-Lei n.º 49/2005, de 24 de Fevereiro, que o republica), solicitou-se ao Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade (ICNB), uma licença para captura, detenção temporária e recolha de material biológico dos indivíduos.

De salientar, que foi complicado a captura destes indivíduos, já que estes não



abundavam nos locais de amostragem escolhidos. A detenção foi restrita ao tempo necessário para a manipulação dos indivíduos com vista à obtenção de uma amostra de material biológico (sangue) in situ. A captura dos indivíduos foi efetuada recorrendo a redes de mão do tipo “camaroeiro” (dip-nets), sendo, posteriormente, anestesiadas usando clorofórmio embebido em algodão (Figura 6).



Figura 6. Captura das rãs *Rana/Pelophylax perezi* e sua imobilização

Na colheita de sangue dos indivíduos anestesiados, utilizaram-se seringas hipodérmicas (uma por indivíduo, para não ocorrer qualquer tipo de contaminação) para extrair cerca de 1 mL de sangue de cada indivíduo (Ver Figura 7).

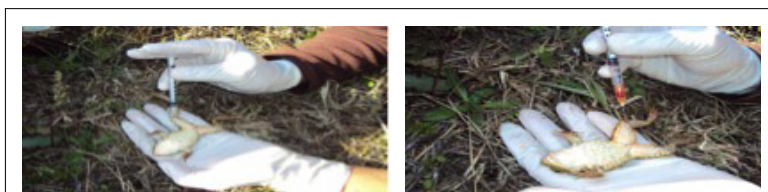


Figura 7. Colheita de material biológico (sangue) das rãs *Rana/Pelophylax perezi*

Após a obtenção de cada amostra biológica, os indivíduos capturados foram todos libertados no respetivo local de captura, não apresentando qualquer tipo de limitação.

### Preparação das amostras

Após a recolha de sangue de cada indivíduo, este foi transferido para um tubo,

para colheita de soro, com gel de separação e ativador de coágulos, sendo imediatamente acondicionado numa arca frigorífica a 4°C. Posteriormente, foram transportadas até ao laboratório, para se efetuar os respetivos processamentos. Todas as amostras de sangue foram centrifugadas a 5000 g usando uma centrífuga refrigerada da marca JP Selecta, à temperatura de 4 °C, durante 10 min, para total separação da fração de soro. O soro foi então retirado para eppendorfs de 1 mL e armazenados numa arca frigorífica à temperatura de -20 °C, antes da medição dos estrogénios por RIA.

## Resultados e discussão

### Quantificação dos estrogénios nas amostras de soro

Os níveis dos estrogénios foram quantificados em cada amostra, em triplicado, após o procedimento experimental descrito nos próprios KITS de estradiol (volume de 200 µL) e estrona (volume de 100 µL).

Após a leitura do sinal (contagens por minuto) de cada amostra, converteram-se os valores para pg mL<sup>-1</sup>, conforme os dados que constam da tabela 3.

Tabela 3. *Caraterização e resultados das concentrações de estrogénios nos indivíduos rã-verde Rana Pelophylax perezi*

	Nº de indivíduos	Género	Estrona média cpm	Estrona média pg/mL	Estradiol média cpm	Estradiol média
Grupo I	4	♂	10258,9	36,75	2595,6	149,431
Grupo II	4	♂	9104,6	53,31	4091,65	37,221
Grupo III	4	♂	8819,4	58,16	2834,05	118,103
Grupo IV	4	♂	6972,35	100,98	4513,3	25,312
Grupo Controle I	4	♂	10439,6	34,52	7553,1	0,0370
Grupo Controle II	4	♂	11869,5	19,34	3963,15	41,798





Analisando os valores das concentrações de estrogénios encontradas nos 24 indivíduos estudados, verifica-se que, os níveis de concentração de estradiol registados são mais elevados que os observados para a estrona, nos grupos experimentais I, III e no grupo de controlo II. O inverso sucede nos grupos experimentais II, IV e grupo de controlo I (Figura 8 e 9).

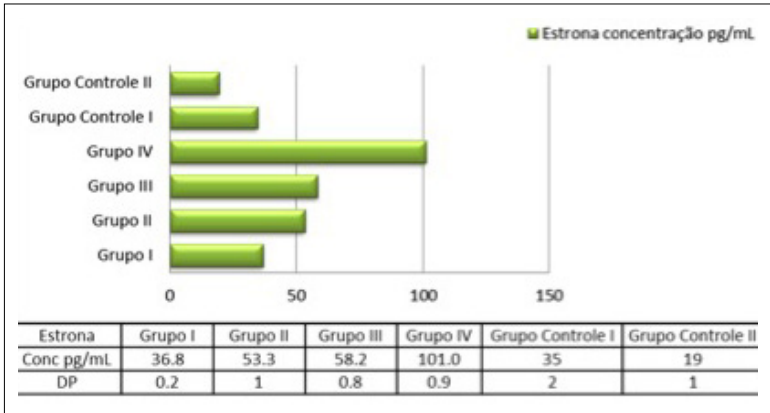


Figura 8. Concentrações de estrona nos indivíduos rã-verde Rana/Pelophylax perezii

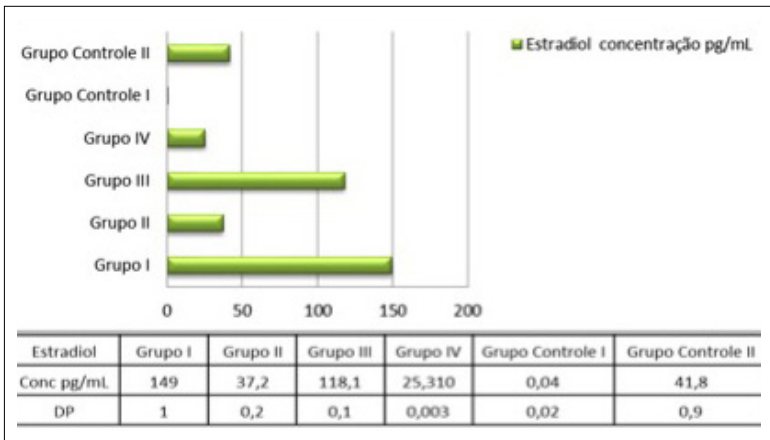


Figura 9. Concentrações de estradiol nos indivíduos rã-verde Rana/Pelophylax perezii

Como na literatura não foram encontrados trabalhos em que a amostra fosse similar, procedeu-se à comparação dos resultados obtidos, entre os grupos experimentais e o grupo de controlo I e controle II, recorrendo-se ao teste de Kruskal Wallis. A posterior comparação entre pares de grupos (Tab. 4) foi realizada com o teste U de Mann-Whitney. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Para a análise estatística foi utilizado o Statistical Package for the *Social Sciences*, versão Windows (SPSS 18.0).

Tabela 4. *Comparação entre os pares de grupos e o grupo de controlo I*

	Estradiol (pg/ml)				Estradiol (pg/ml)			
	n	Média	Desvio-padrão	p <sup>1</sup>	n	Média	Desvio-padrão	p <sup>1</sup>
<b>Grupo I</b>	4	149	1		4	36,8	0,2	
<b>Grupo II</b>	4	37,2	0,2		4	53	1	
<b>Grupo III</b>	4	118,1	0,1	0,001	4	58,2	0,8	0,001
<b>Grupo IV</b>	4	25,310	0,003		4	101,0	0,9	
<b>Grupo de controlo II</b>	4	0,04	0,02		4	35	2	

<sup>1</sup> Kruskal Wallis Test

Para o estradiol existe um predomínio de valores mais elevados nos grupos experimentais face ao grupo de controlo I, com diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,001$ ). Nas comparações entre pares de grupos, envolvendo cada um dos grupos experimentais e o grupo de controlo I as diferenças de valores mantêm-se significativas qualquer que seja o par comparado ( $p < 0,05$ ).

Na estrona a significância estatística permanece para a comparação entre os diversos grupos envolvidos (Tab. 5), igualmente com valores mais elevados para os grupos experimentais. Uma posterior comparação entre pares de grupos revela que tais diferenças são significativas quando em causa os grupos experimentais II a IV e o grupo de controlo I ( $p < 0,05$ ). No par experimental I/controlo I o  $p$  observado foi não significativo.

Tabela 5. Comparação entre os pares de grupos e o grupo de controlo II

	Estradiol (pg/ml)				Estradiol (pg/ml)			
	n	Média	Desvio-padrão	p <sup>1</sup>	n	Média	Desvio-padrão	p <sup>1</sup>
<b>Grupo I</b>	4	149	1		4	36,8	0,2	
<b>Grupo II</b>	4	37,2	0,2		4	53	1	
<b>Grupo III</b>	4	118,1	0,1	0,001	4	58,2	0,8	0,001
<b>Grupo IV</b>	4	25,310	0,003		4	101,0	0,9	
<b>Grupo de controlo II</b>	4	41,8	0,9		4	19	1	

<sup>1</sup> Kruskal Wallis Test

No estradiol, quando o grupo de controlo utilizado é o II, nem sempre o predomínio de valores mais elevado se observa nos grupos experimentais. Em concreto os grupos experimentais II e IV apresentam valores mais baixos que os registados no grupo de controlo. As comparações entre conjunto dos grupos envolvidos registam valor significativo ( $p=0,001$ ), mantendo-se essa significância aquando da comparação entre cada um dos grupos experimentais e o grupo de controlo II ( $p < 0,05$ ).

Na estrona a significância estatística permanece para a comparação entre os diversos grupos envolvidos, igualmente com valores de maior grandeza para os grupos experimentais, sendo as diferenças significativas, quer nas comparações realizadas para o conjunto dos grupos ( $p=0,001$ ), quer na comparação entre pares de grupos (experimental I, II e III versus grupo de controlo II;  $p < 0,05$ ).

Sendo os valores de concentração de estradiol tabelados mais elevados que os observados para a estrona nos grupos experimentais I e III e menos elevados nos grupos experimentais II e IV, cruzaram-se estes dados com o número de habitantes servidos pelas ETARS estudadas no capítulo IV, conforme se pode ver na figura 10.

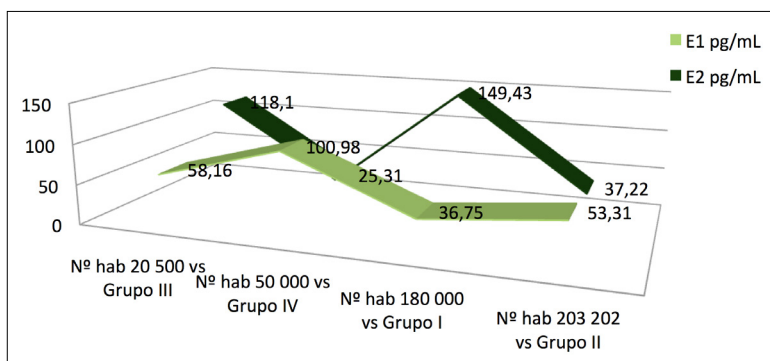


Figura 10. Comparação entre os pares de grupos experimentais e o nº de habitantes que são servidos pelos efluentes das ETARs (rios)

Para a estrona obtiveram-se valores mais elevados para os efluentes das ETARs que servem um nº de habitantes de 20 500 (ETAR 7) e 50 000 habitantes (ETAR 5), existindo um predomínio de valores mais elevados nos efluentes das ETARs que servem um nº de habitantes de 20 500 (ETAR 7) e 180 000 habitantes (ETAR 2), para o estradiol.

De acordo com os resultados obtidos, há uma evidência da persistência de estrona e estradiol à saída das ETARs estudadas, indicando claramente uma ineficiência na remoção destes compostos durante o tratamento das águas residuais, e que são sistematicamente lançadas nos rios, lagos e oceanos, afetando os ecossistemas e a água potável que serve as populações.

## Conclusão

Este estudo fornece evidências sugerindo que a prolongada exposição aos efluentes das ETARs pode causar efeitos cumulativos de estrona e estradiol em indivíduos do género masculino de indivíduos de rã-verde *Rana/Pelophylax perezi*. Devido à falta de estudos com valores de referência de concentração de estrogénios nestes indivíduos, é difícil dizer que os efeitos sejam comparáveis aos efeitos observados e descritos nos vários estudos efetuados em vertebrados, tais como feminização, infertilidade masculina, etc., possivelmente resultando num efeito ao nível da

população. Pode-se, no entanto, deduzir que há processos cumulativos de estrogénios nestes indivíduos do género masculino, que têm o seu habitat natural em ambientes de água doce, nos rios estudados, onde os efluentes das ETARs são lançados, com evidente potencial atividade estrogénica, já que os estrogénios pesquisados são hormonas femininas.

De referir ainda que ao longo da captura destes indivíduos ao longo dos rios, se observaram algumas fêmeas (que não estão incluídas neste estudo) que apresentavam algumas modificações anatómicas, nomeadamente uma pele mais fina, membros superiores e inferiores bastante mais alongados que o normal e uma extrema magreza.

De realçar ainda, que estes animais pela sua natural fisiologia e por viverem na água, têm sido permanente expostos à poluição química presente nos sistemas aquáticos, sendo a atividade estrogénica apontada como uma séria causa para declínio global das várias espécies de anfíbios e a crescente extinção destes animais.

### **Considerações finais**

Atualmente a ocorrência de estrogénios naturais e sintéticos, enquanto fármacos e disruptores endócrinos, podem apresentar efeitos adversos nos humanos, organismos aquáticos e terrestres, podendo ser traduzido num preocupante problema de saúde pública, animal e ambiental, a vários níveis.

Estudos demonstram que estes efeitos podem ser detetados a qualquer nível da hierarquia biológica: célula, órgãos, organismos populações e ecossistemas (Solé, Raldua, Barceló, & Porte, 2003). Estudos têm ligado os DE a efeitos biológicos adversos em animais, dando origem a uma preocupação crescente de que níveis baixos possam causar efeitos similares em humanos, dependendo da dose e do tempo de exposição.

A quantificação precisa de estrogénios naturais e sintéticos nos efluentes das ETARs é primordial na avaliação de uma potencial ocorrência de disrupção endócrina nos seres vivos em geral (Ying *et al.*, 2000;), já que são continuamente lançados nos

sistemas aquáticos, sem qualquer restrição (Bila *et al.*, 2007).

Além da excreção natural dos estrogénios naturais pelos humanos e animais, há que ter uma atenção especial para os estrogénios sintéticos, não só os que são utilizados como anticoncepcionais e nas terapias hormonais, como também os resíduos hospitalares e da indústria farmacêutica, e até medicamentos com prazo de validade expirado e sua eficiente eliminação.

Em Portugal, as informações sobre a ocorrência de estrogénios no ambiente são ainda algo limitadas. Seria desejável um levantamento detalhado para melhor compreender a distribuição destes compostos no ambiente, especialmente nos efluentes das ETARs, nos solos, nas águas superficiais e em águas subterrâneas. Vários estudos efetuados neste campo, noutros países, têm comprovado a seriedade e a diversidade de problemas que podem advir da exposição a estas substâncias.

Assim, o efeito dos DE, na saúde humana e animal deve ser analisado de forma ordenada e qualitativa, tendo-se em consideração as preocupações e necessidades especiais da sociedade dentro das classes e produtos.

Como conclusão deste estudo, pensamos que num futuro próximo, se deve obrigatoriamente implementar um acompanhamento sistemático na determinação de estrógenos em todas as ETARs, de acordo com o número de habitantes que cada uma serve, bem como a aplicação da legislação específica e vigente, ainda que atualmente seja muito escassa, no controlo destes compostos nos efluentes das ETARs; na não utilização de lamas, provenientes do tratamento das águas residuais, como fertilizantes na agricultura; a separação de águas residuais domésticas, hospitalares e industriais e ainda o controlo de administração de hormonas nas pecuárias e aquaculturas.

Nos últimos anos, e em face dos resultados dos vários estudos relativos à sistemática ocorrência e persistência de estrogénios no ambiente, muitos cientistas e pesquisadores pelo mundo, têm efetuado estudos sobre a melhor forma de remover estes compostos nos tratamentos das águas residuais. Contudo, ainda não se conseguiu um tratamento eficiente nas ETARs para estes compostos e outros igualmente nocivos, sendo este um caminho prioritário e obrigatório, como uma questão pertinente de saúde pública animal e ambiental.



## Referências

- Alda, J., & Barceló, D. (2001). Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste water. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 371, 437-447.
- Bila et al, D. M. (2007). Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova*. vol 30 nº 3 651-666.
- Campani, D. M. (2010). Esteroides em águas residuárias - Estado de arte e Perspectivas de Tratamento - VII Simposio Internacional de Qualidade Ambiental. Esteroides em águas residuárias. Porto Alegre, Brasil.
- Desbrow, C. R., & Brighty, G. C. (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent, Chemical Fractionation and in vitro Biological Screening. *Environmental Sci. Technol.* 32 (11), 1549-1558.
- Dudley, R. E. (1985). Guidelines for immunoassay data processing. *Clin. Chem.* 31, 1264-1271.
- Fatta, D., Nikolaou, A., Achilleos, A., & Meric, S. (2007). Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. *Trends in Analytical Chemistry*, 26, 515-533.
- Fonseca, A., Lima, D., & Esteves, V. (2010). Study of estrogenic hormones degradation using UV-Visible Spectroscopy and Capillary Electrophoresis. *Water, Air & Soil Pollution*, 215 (1-4), 441-447.
- Jonhson, A., Belfroid, A., & Di Corcia, A. (2000). *Sci. Total Environ.* 256, 163.
- Kolpin, D., Furlong, E., Meyer, M., Thurman, E., Zaugg, S., Barber, L., et al. (2002). Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater contaminants in U.S. streams 1999-2000: a national reconnaissance. *Environn. Sci. Technol.* 36(6), 1202-1211.
- Laganá, A., Barceló, A., Leva, I., Faberti, A., Fago, G., & Marino, A. (2004). Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 501, 79-88.



- Larsson, D., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A., Olsson, P., et al. (1999). Ethinyloestradiol - an undesired fish contraceptive? *Aquatic Toxicology*, 45, 91-97.
- Miiller, J., & Miller, J. (2005.XVI). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. Harlow (England): Prentice Hall, 268 p. ISBN 0-13-129192-0.
- Orn, S., Holbech, H., Madsen, T., Norgreen, L., & Petersen, G. (2003). Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinyestradiol and methyltestosterona. *Aquatic Toxicology*, 65, 397-411.
- Park, I.-S., Kim, J.-H., Cho, S., & Kim, D. (2004). Sex differentiation and hormonal sex reversal in the bagrid catfish *pseudobragrus fulvidraco*. *Aquaculture*, 232, 183-193.
- Sarmah, A., Northcott, G., F., L., & Tremblay, L. (2006). A survey of endocrine disrupting chemicals (EDAs) in municipal sewage and animal waste effluents in the Waikato Region of New Zeland. *Science of the Total Environment*, 355, 135-144.
- Schneider, C., Scholer, H., & Schneider, R. (2004). A novel enzyme-linked immunosorbent assay for ethinylestradiol using a long-chain biotinylated EE2 derivative. *Steroids* Snyder, 69, 245-253.
- Solé, M., Barceló, D., & Porte, C. (2002). Seasonal variation of plasmatic and hepatic vitellogenin and EROD activity in carp, *Cyprinus Carpio*, in relation to sewage treatment plants. *Aquatic Toxicology*, 60, 233-248.
- Solé, M., Raldua, D., Barceló, D., & Porte, C. (2003). Long-term exposure effects in vitellogenin, sex hormones and biotransformation enzymes in female carp in relation to a sewage treatment works. *Ecotoxicology and environmental Safety*, 56, 373-380.
- Streck, G. (2009). Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environmental. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(6), 635-652.





- Skoog, D., Nieman, T., & Holler, F. (2002). *Princípios de análise instrumental*, 5ª edição. Brasil: Bookman.
- Ternes, T., Kreckel, P., & Mueller, J. (1999). Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *The Science Total Environmental*, 225, 91-99.
- Versonnen, B., & Janssen, C. (2004). Xenoestrogenic effects of ethinylestradiol in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol.*, 19, 198-206.
- Wang, S., Xu, Z., Fang, G., Zhang, Y., & He, J. (2008). Separation and determination of estrone in environmental and drinking water using molecularly imprinted solid phase extraction coupled with HPLC. *J. Sep. Sci.*, 30, 1181-1188.
- Wise, A., O'Brien, K., & Wooddruff, T. (2011). Are oral contraceptives a significant contributor to the estrogenicity of drinking water? *Environmental Science Technology*, 45, 51-60.
- Yan, W., Feng, Q., Wei, Y., & Lin, J. (2009). Simultaneous determination of ten estrogens and their metabolites in waters by improved two-step SPE followed by LC-MS. *Chromatographia*, 69, 621-628.
- Ying, G., Kookana, R., & Ru, Y. (2002). Occurrence and fate of hormones steroids in the environment. *Environmental International*, 28, 545-551.