



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro de Tecnologia e Ciências  
Faculdade de Engenharia

Louise da Cruz Felix Valadares

**Avaliação da estrogenicidade, ecotoxicidade e caracterização de  
sedimentos de praias em Angra dos Reis**

Rio de Janeiro  
2020

Louise da Cruz Felix Valadares

**Avaliação da estrogenicidade, ecotoxicidade e caracterização de sedimentos  
de praias em Angra dos Reis**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de Concentração: Saneamento Ambiental- Controle da Poluição Urbana e Industrial.



Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Daniele Maia Bila

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/B

V136 Valadares, Louise da Cruz Felix.  
Avaliação da estrogénicidade, ecotoxicidade e caracterização  
de sedimentos de praias em Angra dos Reis / Louise da Cruz  
Felix Valadares. – 2020.  
58f.

Orientadora: Daniele Maia Bila.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de  
Janeiro, Faculdade de Engenharia.

1. Engenharia ambiental - Teses. 2. Água - Poluição - Teses.  
3. Testes de toxicidade - Teses. 4. Sedimentos fluviais - Teses.  
5. Análise cromatográfica - Teses. I. Bila, Daniele Maia. II.  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de  
Engenharia. III. Título.

CDU 502.51:504.5

Bibliotecária: Júlia Vieira – CRB7/6022

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial  
desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Louise da Cruz Felix Valadares

**Avaliação da estrogenicidade, ecotoxicidade e caracterização de sedimentos  
de praias em Angra dos Reis**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de Concentração: Saneamento Ambiental- Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Aprovada em

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Daniele Maia Bila, D. Sc (Orientadora)  
Faculdade de Engenharia – UERJ

---

Prof. Dr. Carlos Marclei  
Universidade Federal Fluminense – UFF

---

Dra. Marília Teresa Lima do Nascimento, D. Sc  
Universidade Federal Fluminense – UFF

Rio de Janeiro

2020

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sua graça e misericórdia, que me permite a cada dia prosseguir em Seu caminho.

Aos meus amados pais que nunca mediram esforços para educar seus três filhos. À minha mãe que teve a maior paciência do mundo e abriu mão de si própria por nós. Foi ela a responsável pela formação de carácter e pela instrução acadêmica dos seus filhos. Minha inspiração de mulher. Ao meu papaizinho que sempre nos fortaleceu para sermos o melhor que podemos e nos ensinou a ter garra para conquistar o mundo. Minha fortaleza.

À minha família todinha que sempre me deu suporte, em inúmeras maneiras. Deus foi maravilhoso ao me tornar integrante desta família bagunçada e unida. Ao meu avô que serve de inspiração para todos que o conhecem. Às minhas avós que sempre tiveram muita fibra e são exemplos de mulher. Às minhas tias que são minhas mães substitutas, que me deram amor infinito e sempre batalharam muito pela família. Aos meus primos que são meus primeiros e maiores amigos do mundo.

Aos meus irmãos. Faltam palavras para descrever tudo o que eles representam para mim. Só tenho a agradecer pela inspiração e motivação, e por todo amor e cuidado direcionados a mim.

Às minhas amigas-irmãs, LuNaMaGiKa, que enchem minha vida de esperança. Uma amizade que ensina muito sobre paciência, perseverança e amor sem julgamento, mas muita força.

Aos meus queridos companheiros do LES, que se tornaram minha família ao longo destes anos de parceria. Não teria feito nada sem a ajuda deles. Eles tornaram meus dias melhores mesmo nos momentos mais tensos.

Aos amigos que a UFF me trouxe, só tenho que agradecer. Obrigada por terem me levado a um novo ambiente universitário, por terem me emprestado equipamentos e métodos para o trabalho desenvolvido.

À Banca maravilhosa composta por pesquisadores que admiro e respeito. Obrigada por toparem essa empreitada de última hora. Obrigada pela disponibilidade e paciência. Marília, você é uma mãezona para mim, preciso te agradecer por todo suporte e confiança. Obrigada por me instruir em bons caminhos

e puxar minha orelha quando eu precisei. Marclei, obrigada pela parceria neste projeto e por confiar no trabalho feito.

Agradeço à minha amada e perfeita orientadora Daniele Bila, sem ela nada disso seria possível! Muito obrigada por me orientar desde a graduação e por ser minha maior inspiração como profissional. Obrigada por todos os ensinamentos, broncas, momentos de escutar meus desabafos, por toda paciência, por perseverar em mim, por confiar no meu trabalho, e por tantas outras coisas. Eu preciso agradecer pelo resto da minha vida por tudo o que você é e representa para mim.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para o meu crescimento como pessoa e como profissional, possibilitando a conclusão de mais uma etapa na minha vida.

## RESUMO

VALADARES, L. da C. F. *Avaliação da estrogenicidade, ecotoxicidade e caracterização de sedimentos de praias em Angra dos Reis*. 2020. 58f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

O crescimento populacional desordenado, a ocupação de áreas marginais a cursos d'água e a precariedade do atendimento das redes de saneamento nos municípios fluminenses são fatores que contribuem com o lançamento de poluente, dentre eles os desreguladores endócrinos (DE), no meio ambiente. O despejo de efluentes, sem tratamento, nos corpos hídricos dos municípios promove a alteração na composição da biota local e descaracteriza as áreas sedimentares. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivos realizar a caracterização físico-química e avaliar o potencial ecotoxicológico e estrogênico de sedimentos das praias Grande e da Biscaia, localizadas em Angra dos Reis. Foram realizadas coletas em diferentes períodos do ano com a finalidade de avaliar a presença dos compostos bisfenol-A e dos hormônios  $17\beta$ -estradiol, estriol (naturais) e  $17\alpha$ -etinilestradiol (sintético) nesta matriz. Para cada ponto coletado foram determinados os seguintes parâmetros físico-químicos: granulometria, pH, teor de umidade, teor de matéria orgânica e carbono orgânico total (COT). A toxicidade foi avaliada por ensaio com elutriato exposto a bactéria bioluminescente *Vibrio fischeri*. Para a determinação dos DEs nas amostras de sedimento e para a avaliação do potencial estrogênico utilizou-se as técnicas de extração por solvente em banho ultrassônico (USE) seguido de extração em fase sólida (EFS). O ensaio YES foi a ferramenta selecionada para avaliação da atividade estrogênica nos extratos dos sedimentos. Os resultados das análises físico-químicas mostraram que os sedimentos da região são mais arenosos, com grânulos grandes e com baixo teor de matéria orgânica e de carbono orgânico total, tendo uma característica de pH neutro. Os ensaios de estrogenicidade na primeira campanha apresentaram citotoxicidade em 2 pontos de coleta da praia da Biscaia e em 1 ponto da praia da Biscaia na segunda campanha, nos demais pontos não houve citotoxicidade. A maioria dos pontos apresentaram resultados abaixo do limite de detecção do método. Apenas na segunda coleta da praia Grande, dois pontos apresentaram atividade estrogênica (4,7 e 2,1 ng/g EqE2). Os resultados de cromatografia para a primeira campanha não foram significativos. Na segunda campanha, dois pontos da praia Grande foram quantificados analiticamente, sendo no primeiro identificado 2,16 ng/g de E3 e no último ponto 1,05 ng/g de BPA. O uso de elutriato para verificação de toxicidade mostrou um efeito de estímulo da emissão de luz pelas bactérias bioluminescentes.

Palavras-chave: Sedimentos; Desreguladores endócrinos; *Vibrio fischeri*; Cromatografia.

## ABSTRACT

VALADARES, L. da C. F. *Evaluation of estrogenicity, ecotoxicity and characterization of beach sediments in Angra dos Reis*. 2020. 58f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

The disordered population growth, the occupation of watercourses' marginal areas and the precariousness of sanitation networks in the municipalities of Rio de Janeiro are factors that contribute to the release of pollutants, among them the endocrine disruptors (DE), in the environment. The discharge of effluents, without treatment, in the water bodies of the municipalities promotes a change in the composition of the local biota and mischaracterizes the sedimentary areas. In this context, this work aimed to carry out the physical-chemical characterization and to evaluate the ecotoxicological and estrogenic potential of sediments from the beaches, Grande and Biscaia, located in Angra dos Reis. Collections were carried out at different times of the year in order to assess the presence of the compounds bisphenol-A and the hormones  $17\beta$ -estradiol, estriol (natural) and  $17\alpha$ -ethinylestradiol (synthetic) in this matrix. For each point collected, the following physical-chemical parameters were determined: granulometry, pH, moisture content, organic matter content and total organic carbon (TOC). Toxicity was assessed by an elutriate test exposed to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*. For the determination of DEs in the sediment samples and for the evaluation of the estrogenic potential, the techniques of solvent extraction in ultrasonic bath (USE) followed by extraction in solid phase (EFS) were used. The YES assay was the tool selected to evaluate estrogenic activity in sediment extracts. The results of the physical-chemical analyzes showed that the sediments of the region are more sandy, with large granules and with low content of organic matter and total organic carbon, having a characteristic of neutral pH. The estrogenicity tests in the first campaign showed cytotoxicity in 2 collection points of Praia da Biscaia and in 1 point of Praia da Biscaia in the second campaign, in the other points there was no cytotoxicity. Most points showed results below the detection limit of the method. Only in the second collection of Praia Grande, two points showed estrogenic activity (4.7 and 2.1 ng / g EqE2). The chromatography results for the first campaign were not significant. In the second campaign, two points on Praia Grande were analytically quantified, with the first identifying 2.16 ng / g of E3 and the last 1.05 ng / g of BPA. The use of elutriate to check for toxicity showed a stimulating effect on the emission of light by bioluminescent bacteria.

Keywords: Sediments; Endocrine disruptors; *Vibrio fischeri*; Chromatography.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estações de tratamento de esgoto já construídas e inauguradas em Angra dos Reis e as planejadas para criação.....	16
Figura 2: Possíveis rotas de contaminação de sistemas aquáticos por desreguladores endócrinos. ....	22
Figura 3: Esquema das etapas de extração.....	27
Figura 4: Grupo ligante do Strata X; Grupo ligante do Stratata SAX, respectivamente. ....	27
Figura 5: Ilustração de <i>Aliivibrio fisheri</i> , organismo utilizado para teste de toxicidade .....	29
Figura 6: Esquema metodológico da 2ª fase do trabalho (etapa experimental) .....	31
Figura 7: Mapa de localização dos pontos de coleta nas praias de Angra.....	32
Figura 8: Esquema com as etapas de extração de sedimentos adotadas. ....	37
Figura 9: Esquema representativo das etapas seguidas para extração dos sedimentos. ....	38
Figura 10: Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência utilizado neste trabalho. ....	41
Figura 11: Equipamento Microtox M500.....	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de referência das propriedades físico-químicas relevantes para o destino e comportamento de desreguladores endócrinos. ....	20
Tabela 2: Propriedades físico-químicas de alguns DE estrogênicos.....	21
Tabela 3: Variáveis utilizadas para a avaliação da qualidade dos sedimentos .....	24
Tabela 4: Valores de equivalente estradiol para os sedimentos teste analisados para definição da metodologia. ....	43
Tabela 5: Resultado do ensaio YES para as amostras de água da primeira campanha de Angra. ....	44
Tabela 6: Resultado dos parâmetros físico-químicos das amostras de sedimento da primeira campanha.....	46
Tabela 7: Resultado de atividade estrogênica para as amostras de sedimento de Angra da primeira campanha. ....	46
Tabela 8: Resultado dos parâmetros físico-químicos das amostras de sedimento da segunda campanha.....	47
Tabela 9: Resultado de atividade estrogênica para as amostras de sedimento de Angra da segunda campanha. ....	49

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>14</b>
1.1 SANEAMENTO .....	14
1.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS .....	17
1.3 CARACTERIZAÇÃO DE SEDIMENTOS .....	22
1.4 PARÂMETROS DE QUALIDADE DOS SEDIMENTOS.....	23
1.5 METODOS DE EXTRAÇÃO DE SEDIMENTOS .....	26
1.6 ECOTOXICIDADE .....	28
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
2.1 COLETA E PRESERVAÇÃO .....	32
2.2 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS .....	33
2.3 TEOR DE UMIDADE .....	33
2.4 MATÉRIA ORGÂNICA DE SEDIMENTOS MUFLA .....	34
2.5 TOC DE SEDIMENTOS .....	34
2.6 PREPARO DE ELUTRIATO PRA SISTEMA MICROTOX®.....	35
2.7 GRANULOMETRIA DE SEDIMENTOS.....	35
2.8 EXTRAÇÃO DOS SEDIMENTOS.....	36
2.9 DOPAGEM DOS SEDIMENTOS.....	39
2.10 ENSAIO DE ATIVIDADE ESTROGÊNICA – YES .....	40
2.11 CROMATOGRAFIA.....	40
2.12 ENSAIO DE ECOTOXICIDADE .....	41
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>52</b>

## INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem mostrado crescente interesse nos estudos sobre desreguladores endócrinos (DE) devido a sua capacidade de provocar danos à saúde dos seres humanos e demais organismos mesmo em baixas concentrações. Os estudos sobre este tema têm sido considerados como um desafio no âmbito do controle da poluição ambiental, sendo necessário propor novos métodos de detecção, quantificação e tratamento para remoção dos mesmos do meio (OMS, 2012). Alguns dos efeitos sobre a saúde da população exposta a estes contaminantes descritos por esta organização são as doenças nos sistemas imunológico, endócrino e reprodutor, aumento na incidência de câncer, antecipação da puberdade nas meninas, dentre outras problemáticas.

Existe uma vasta gama destes contaminantes emergentes podendo ser exemplificado como os hormônios naturais, como estrogênios, androgênios e fito estrogênios; químicos industriais; hormônios sintéticos; hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs); compostos clorados (PCBs, dioxinas); alquifenois fármacos e pesticidas (Bila e Dezotti, 2007). Os estrogênios podem ser considerados de maior relevância devido a sua contínua liberação no ambiente, mesmo que apresentem um tempo de meia-vida menor quando comparado a outros contaminantes emergentes (Reis Filho et al., 2006).

O surgimento destes no meio ambiente ocorre principalmente pelo despejo de efluentes nos corpos hídricos, principalmente em grandes sítios urbanos com lançamento de esgoto doméstico *in natura* em rios (De Oliveira et al., 2020). No Brasil, apenas parte de sua população é atendida pelo sistema de esgotamento sanitário, o que acarreta na degradação de rios que servem como fontes de captação para abastecimento público de água. Em uma grande metrópole como o estado do Rio de Janeiro, apenas 59% da população é atendida por sistemas de coleta e tratamento de esgotos (SNIS, 2011). Tampouco, as estações de tratamento de água e esgoto existentes não possuem a tecnologia necessária para promover a completa remoção dos compostos emergentes, levando assim a sua bioacumulação destes no meio.

Com isto, temos a biota aquática diretamente afetada por estes contaminantes que, mesmo em baixas doses, são lançados diariamente nos rios e

oceanos, podendo alcançar as redes de abastecimento de água. Uma vez que estes poluentes são lançados no compartimento aquático, podem sofrer processos como advecção (transporte através da corrente), biotransformação, oxidação ou redução, adsorção nos sedimentos e resuspensão quando incorporadas ao material particulado (Silva, 2016). Devido à baixa solubilidade em água, a baixa volatilidade, a natureza hidrofóbica, aos altos coeficientes de partição octanol/água ( $K_{ow}$ ) e de partição matéria orgânica/água intersticial ( $K_{oc}$ ) desses contaminantes, a matriz sedimento pode agir como reservatório para os micropoluentes podendo afetar negativamente os organismos aquáticos (Grund et al., 2010; Schäfer et al., 2011). Sendo assim, é necessário um aprofundamento no estudo desses efeitos, levando em consideração os parâmetros físico-químicos da matriz sedimento – atuante como destino final desses contaminantes – e os métodos de detecção de contaminantes emergentes em matrizes ambientais.

Nesse contexto, o presente trabalho aborda possíveis alternativas de detecção e quantificação de compostos emergentes, especificamente os hormônios, 17-etinilestradiol (EE2), 17-estradiol (E2) e estriol (E3) e o bisfenol A (BPA), bem como o potencial estrogênico de amostras de sedimentos coletados em praias da região de Angra dos Reis. O estudo busca traçar uma correlação dos parâmetros físico-químicos avaliados com a eficiência dos métodos de detecção, tendo ainda como objetivo avaliar o potencial tóxico desta matriz aos organismos aquáticos a eles expostos. Portanto, este trabalho pode auxiliar na geração de dados necessários para compor políticas públicas – instrumentos de planejamento, monitoramento ou ações – relacionadas à dinâmica de contaminantes emergentes no meio aquático com ênfase nos efeitos gerados aos sedimentos de praias.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Avaliar a qualidade dos sedimentos em duas praias localizadas no município de Angra dos Reis (RJ, Brasil) por meio de análises ecotoxicológica, cromatográfica e de atividade estrogênica. Levando em consideração a análise granulométrica de cada ponto estudado bem como os parâmetros físico-químicos para caracterização dos sedimentos e a variação sazonal dos períodos de coleta.

### **Objetivos Específicos**

- i. Realizar a caracterização físico-química dos sedimentos coletados;
- ii. Avaliar a toxicidade dos sedimentos por meio de ensaio ecotoxicológico;
- iii. Estabelecer uma metodologia para preparo de extrato de sedimento para análise de micropoluentes;
- iv. Avaliar a presença de estrogenicidade nos extratos de sedimento;
- v. Quantificar analiticamente a presença de hormônios (E2, EE2 e E3) e BPA nos extratos dos sedimentos;
- vi. Avaliar a recuperação do ensaio de extração no preparo das amostras de sedimento;

# 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 Saneamento

A população do Brasil é estimada em 210,1 milhões de habitantes distribuídos em 26 Estados, sendo 5570 municípios mais o Distrito Federal, e apresenta uma taxa de crescimento populacional de 0,79% ao ano (IBGE, 2019). Segundo o último relatório do Plano Nacional de Saneamento Básico (PNSB) elaborado pelo IBGE (2017) 60,3% dos municípios da federação é atendida por sistema de esgoto. No entanto, este relatório considera que mesmo que o município não seja atendido por rede coletora de esgoto em sua totalidade de domicílios, ainda assim o município entra no percentual de atendidos por sistema de esgoto, dando assim uma estimativa otimista do tratamento de esgoto do país.

O Instituto Trata Brasil elabora anualmente desde 2009 um relatório de indicadores de saneamento baseado nos dados fornecidos pelo Ministério das Cidades (SNIS). Na última versão do documento o percentual de municípios atendidos por sistema de esgoto é de 53,2%. O lançamento *in natura* de esgoto pelos municípios não atendidos acarretou um lançamento de aproximadamente 5.622 piscinas olímpicas de esgoto não tratado nas bacias hidrográficas do país, em 2017 (Instituto Trata Brasil – Ranking do Saneamento 2019).

No Rio de Janeiro mais de 70% dos seus municípios possui pelo menos uma rede coletora de esgoto, no entanto menos de 50% dos domicílios é realmente esgotado. Sendo que é o estado com maior demanda de água, tendo um consumo de 680,3 L por economia por dia (PNSB, 2017), quase 51% a mais que a média de consumo da Região Sudeste. Esses dados contrastantes mostram que é um estado com uma alta geração de esgoto não tratado que acaba sendo lançado nos rios, ocasionando a degradação dos mesmos. O fato de no Estado ainda haver estações que não possuem as licenças ambientais necessárias para operação ou não tiveram as obras finalizadas (CEDAE) torna a realidade do tratamento de esgoto inda mais problemática.

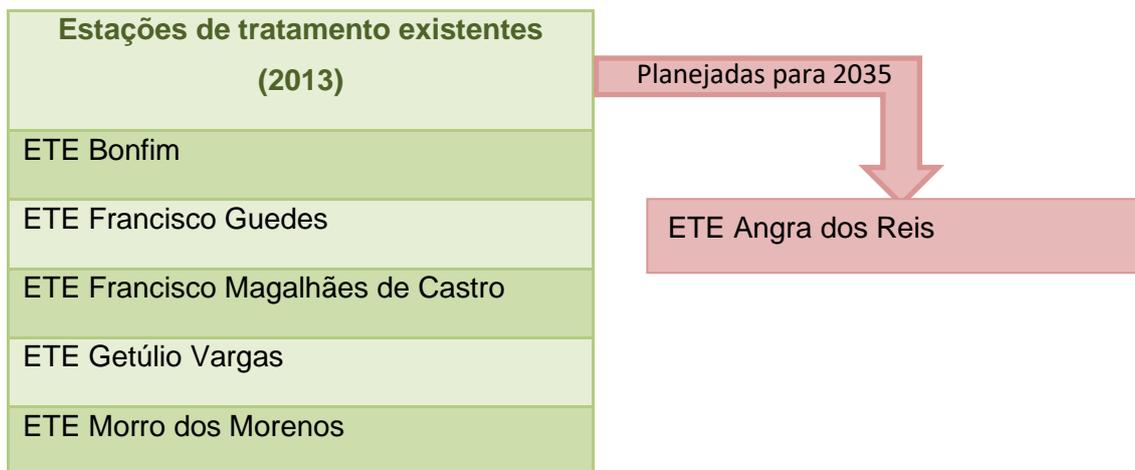
Considerando o crescimento populacional e a falta de estruturas de saneamento básico que atendam integralmente a população, é passível de questionamento a situação atual da qualidade ambiental dos corpos hídricos do estado, principalmente devido ao déficit na questão de tratamento e despejo de

esgotos. Segundo o levantamento da Pesquisa de Informações Básicas Municipais / Munic, apenas 41,5% dos municípios brasileiros dispunham de um Plano Nacional de Saneamento Básico em 2017, e apenas 38,2% tinham uma Política Municipal de Saneamento Básico neste mesmo período. O resultado da falta de planejamento se reflete na saúde, onde um em cada três municípios apresenta epidemias ou endemias provocadas pela falta de saneamento básico (IBGE, 2018).

Na região de Angra dos Reis, a companhia de esgoto (SAAE) atende com tratamento de esgoto a 46,7% da população urbana o que representa 45% da população total do município (SNIS, 2011). Segundo o relatório do SNIS (2011), 82,4 % do esgoto que é coletado chega a ser tratado, o que corresponde a 45,8 % do esgoto total gerado no município. A parte coletada e não tratada é lançada diretamente na rede pluvial ou nos corpos hídricos. O tratamento pode variar conforme a localidade, sendo constituído pelos seguintes tipos: fossas sépticas e filtro anaeróbio individual, fossas sépticas e filtro anaeróbio coletivo, lodo ativado convencional (LAC) e reator anaeróbio de fluxo ascendente (RAFA).

A localidade de Jacuecanga é atendida pelo SAAE com ETE do LAC. O Condomínio Morada do Bracuí e os núcleos de Japuíba, Praia da Chácara, Bonfim, Pousada da Glória e Monsuaba são atendidas com ETEs tipo RAFA. Os restantes dos núcleos atendidos pelo SAAE (Parque Mambucaba, Boa Vista, Frade, Serra D'Água, Belém, Campo Belo, Sapinhatuba, Praia do Machado, Monsuaba (parte) e Água Santa) utilizam sistemas coletivos de Tanque Séptico e Filtro Anaeróbio. O restante da população da área continental tem o esgoto jogado em valas a céu aberto ou lançado diretamente na rede de águas pluviais (Francisco, 2004; SAAE, 2013). O Plano municipal de saneamento prevê uma abrangência maior da rede de coleta e tratamento de esgoto de todo o município. A Figura 1 mostra as estações já existentes e as planejadas para atendimento da população da região de Angra dos Reis até 2035.

Figura 1: Estações de tratamento de esgoto já construídas e inauguradas em Angra dos Reis e as planejadas para criação.



As estações de tratamento de esgoto existentes, além de não serem suficientes para atender toda a população fluminense, muitas apresentam problemas de operação como, baixa vazão no tronco coletor; problemas associados à instalação elétrica da estação; furtos de cabos e equipamentos; falta de bombas, depredação da população, má utilização da bomba, entre outros. Além destes, muitas não possuem rede coletora associada à estação ou operam com ineficiência de tratamento prevista em projeto.

Mediante a tantos problemas encontrados nos sistemas de saneamento do município, não há a mínima seguridade de atendimento aos parâmetros básicos definidos em normativa para lançamento de efluentes e qualidade das águas, como os padrões definidos na Conama 537 e 430. Sendo assim, se pode estender essa problemática aos contaminantes que não estão previstos em legislação para monitoramento, que acabam sendo totalmente desconsiderados nas unidades de tratamento convencionais.

Esses contaminantes que não possuem uma legislação vigente que defina padrões e limites de lançamento no meio ambiente são chamados de emergentes. No entanto, a falta de monitoramento destes compostos não pode ser correlacionada como ausência de problemas ocasionados ao meio ambiente, pois alguns destes compostos já estão sendo estudados e causam efeitos deletérios aos organismos expostos (K'oreje et al., 2020; De Oliveira et al., 2020). Dentre esta

classe de substâncias, este trabalho visa estudar os desreguladores endócrinos, especificamente os hormônios naturais E2, E3 e EE2 e o BPA.

Os desreguladores endócrinos causam modificações no sistema reprodutivo como, por exemplo, câncer, feminização, alterações na transcrição genética, alteração nas gônadas, indução à síntese de vitelogenina, entre outros (Solomon e Schettler 2000; Kabir et al., 2015; Darbre, 2019). Por isso, além das características toxicológicas e composição físico-química dos esgotos sanitários que já são comumente estudas por todo território brasileiro, surgem novas questões de interesse para melhoria da qualidade ambiental e determinação de tratamentos adequados.

A falta de investimento na questão do saneamento do Estado do Rio de Janeiro faz com que o esgoto da maior parte da população seja lançado diretamente, *in natura*, ou com tratamento insuficiente para remoção de toxicidade deste efluente nos rios e lagos. Fato que leva a uma crítica realidade de contaminação hídrica estendido à toda população, principalmente a população de classe mais baixa que fica mais exposta aos poluentes. Esta problemática traz malefícios também para a biota, que sofre com a morte dos rios, extinção de espécies e anomalias nas espécies.

## **1.2 Desreguladores endócrinos**

Recentemente, muitos contaminantes ambientais têm despertado interesse da comunidade científica e regulatória. Os contaminantes ou poluentes emergentes são aqueles que ainda não são de monitoramento normativo, tampouco inserido em legislações de controle ambiental, devido à incerteza de seu potencial tóxico, efeitos e presença no ambiente.

Com isso, temos o termo “emergente” significando a recente preocupação nos estudos de detecção, quantificação e efeitos para a biota destes compostos presentes no ambiente. Podemos citar como exemplo os ftalatos, medicamentos, cosméticos, alguns pesticidas, retardadores de chama, aditivos de gasolina, tensoativos, nanomateriais, surfactantes, produtos de desinfecção, esteróis e hormônios, dentre outros (Darbre, 2019). Muitas contaminantes emergentes já fazem parte de nosso dia-dia há décadas, porém a presença destes nos diferentes

compartimentos ambientais e os impactos gerados nos organismos só entraram em pauta para os estudos nos últimos anos.

O Serviço Geológico dos Estados Unidos (USGS – do inglês *United States Geological Survey*) define um contaminante emergente como:

“qualquer microorganismo ou substância química natural ou sintética que não é monitorada, mas que é capaz de surgir no ambiente e provocar efeitos adversos conhecidos ou não sobre ecossistemas e/ou sobre a saúde humana”.

A definição da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA – do inglês *United States Environmental Protection Agency*) para esta classe de contaminantes é:

“Poluentes que atualmente não são incluídos em programas de monitoramento e que podem se tornar candidatos para legislações futuras dependendo de pesquisas sobre (eco)toxicidade, efeitos sobre a saúde, percepção pelo público e dados sobre sua ocorrência e vários compartimentos ambientais”.

A entrada destes poluentes no meio ambiente se dá por várias vias, como por exemplo, emissões, rejeitos industriais e urbanos, estações de tratamento, fontes difusas, deposição atmosférica, descarte de medicamentos ou outros descartes incorretos (Campbell et al., 2006).

Contudo, as estações de tratamento de esgoto são consideradas as fontes mais expressivas destes compostos, devido a não preconização do tratamento destes nos sistemas atualmente adotados. Sobre tudo, os biosólidos das estações e as águas de reuso podem conter concentrações significantes dos compostos emergentes (Pal et al., 2010, Andaluri et al., 2012; Pessoa et al., 2014, Belhaj et al., 2015).

Como mencionado no capítulo anterior, o sistema de tratamento e coleta de esgoto adotado nacionalmente não atende adequadamente toda a sua extensão territorial, portanto, o despejo contínuo de contaminantes emergentes por meio do esgoto pode ser considerado uma das principais fontes destes no meio.

Contudo, há um crescente aporte destes compostos provenientes da agricultura moderna e sistemas de disposição de resíduos, sendo assim considerados como importantes fontes a serem estudadas (Adeel et al 2017). Os autores ainda defendem a importância da definição de valores base para fins de controle nos ambientes aquáticos e terrestres.

Dentre os contaminantes emergentes, se destaca uma classe denominada desreguladores endócrinos, DE, (interferentes ou disruptores endócrinos, do inglês, *endocrine disruptors*), a qual é definida por ser um composto que causa alteração no sistema endócrino dos seres vivos. Podendo causar modificações na síntese, transporte e ação dos hormônios naturais do sistema, podendo provocar danos reprodutivos, comportamentais ou de desenvolvimento nos organismos a eles expostos. A USEPA os define como:

“um interferente endócrino é um agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento”

A Comunidade Européia estende os efeitos adversos dos desreguladores endócrinos à prole dos organismos expostos, sendo, portanto possível observar um efeito adverso apenas em gerações subsequentes àquelas expostas. A ação destes compostos ocorre pelo bloqueio, pela mimetização, estimulação, ou inibição da produção dos hormônios naturais. Estes compostos são amplamente utilizados pela sociedade moderna, sendo encontrados em produtos farmacêuticos, produtos de uso pessoal (como ex. as fragrâncias), pesticidas, antioxidantes, plásticos, produtos industrializados, tensoativos entre outros.

De forma simplificada, pode-se explicitar os mecanismos de ação destes compostos em um receptor hormonal, provocando respostas, tais como:

- Célula em processo normal: um hormônio natural se liga a seu receptor e ativa os genes no núcleo da célula para proteger respostas biológicas apropriadas;
- Célula sob efeito de um mimetizador: o interferente endócrino é parecido com estrógenos e pode se ligar ao receptor hormonal, imitando (mimetizando) a ação de um hormônio natural e produzindo uma resposta. Este processo é chamado de efeito agonista;
- Célula sob efeito de um bloqueador: os interferentes endócrinos podem também se ligar ao receptor bloqueando a ação hormonal, não desencadeando uma resposta, mas impedindo que os hormônios naturais se encaixem ao receptor. Este processo é chamado de efeito antagonista.

Entender as propriedades físico-químicas dos compostos estrogênicos é fundamental para conhecer a ação, o comportamento e seu destino nos compartimentos ambientais, sistemas aquáticos e sólidos. A distribuição de poluentes orgânicos em meio líquido ou sólido é definido basicamente pelo coeficiente de partição de fase orgânica e aquosa. O coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ) expressa essa maior afinidade de um composto com determinada matriz sob condições de equilíbrio definidas a determinada temperatura.

Compostos com elevado peso molecular e alto índice log kow são facilmente adsorvidos aos sedimentos e podem ser removidos por coagulação (Adeel et al 2017). A maioria dos desreguladores endócrinos (DE) tem tendência à partição em meio líquido, adsorvendo-se a superfícies sólidas ou a biota. Esta tendência é regida por propriedades como solubilidade em água e os coeficientes de partição (Tabela 1).

Tabela 1: Valores de referência das propriedades físico-químicas relevantes para o destino e comportamento de desreguladores endócrinos.

Propriedade físico-química	Potencial	Valores de referência		
		Baixo	Moderado	Alto
<b>Solubilidade em água</b>	Solubilização ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	< 1	–	1 000
<b>Coefficiente de partição carbono orgânico-água</b>	Sorção ( $\log K_{oc}$ )	< 3	–	> 3
<b>Coefficiente de partição octanol-água</b>	Bioacumulação ( $\log K_{ow}$ )	< 2,5	2,5 – 4,0	> 4

Fonte: Adaptado de Argolo (2018).

A solubilidade em água é definida como a concentração máxima de uma substância dissolvida em água pura, usualmente a 25 °C. Os coeficientes de partição estão relacionados à tendência de determinada substância a fracionar-se em duas fases, sendo definidos pela razão das concentrações da substância nas duas fases de referência no equilíbrio e usualmente expressos na forma logarítmica.

O grau de hidrofobicidade/lipofilicidade de determinada substância é representado pelo coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ), mas também está relacionado à polaridade da substância e também aumenta conforme peso molecular da substância. Além deste fracionamento, outro fenômeno de interesse é a sorção, que está ligado à mobilidade das substâncias no meio. A capacidade de

adsorção pode ser mensurada pelo coeficiente de partição carbono orgânico-água ( $K_{oc}$ ), que também aumenta conforme a hidrofobicidade e o  $\log K_{ow}$  (Ma e Yates, 2018), ainda que a presença de carbono orgânico não seja um pré-requisito para a sorção ao material particulado (Lai et al., 2000). A constante de dissociação ácida (pKa) caracteriza a tendência da substância em se dissociar no meio aquático e a interação eletrostática, os quais se relacionam com a adsorção (Ghiselli, 2006).

A partir da Tabela 2, conclui-se que muitos dos DE estrogênicos têm características lipofílicas, hidrofóbicas e, quando solúveis em água, podem ser transferidos da fase aquosa para a fase sólida por meio de sorção a sólidos suspensos. Assim, é previsível que a sorção ao solo, a sedimento ou a lodo biológico seja um processo significativo (Lai et al., 2000; Pal et al., 2010).

Tabela 2: Propriedades físico-químicas de alguns DE estrogênicos.

Composto	Massa molecular	pKa	Pressão de vapor (Kpa)	Log $K_{ow}$	Log $K_{oc}$	Solubilidade (mg.L <sup>-1</sup> )
<b>17<math>\alpha</math>-etinilestradiol (EE2)</b>	296,4	10,4	$6 \times 10^{-9}$	4,15	3,67	4,8
<b>17<math>\beta</math>-estradiol (E2)</b>	272,4	10,6	$3 \times 10^{-8}$	3,94	3,52	13,0
<b>Estriol (E3)</b>	288,4			2,81	3,29	13,0
<b>Estrona (E1)</b>	270,4	10,3	$3 \times 10^{-8}$	3,43	3,69	13,0
<b>Bisfenol A (BPA)</b>	228,0			3,32	2,50	120,0

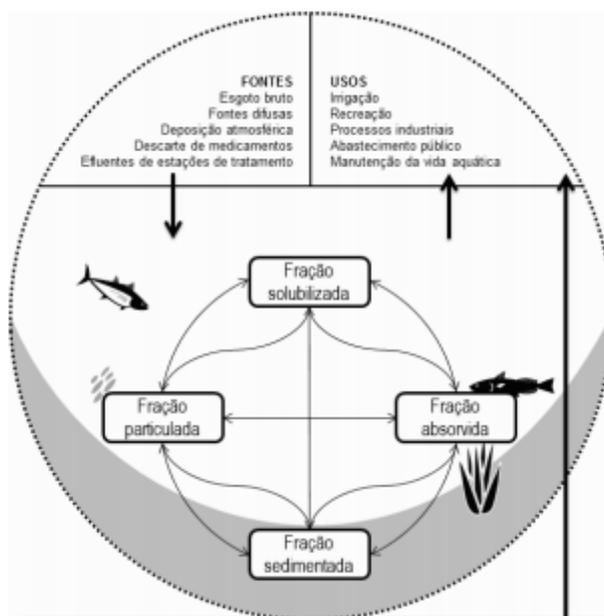
Fonte: Adaptado de Argolo (2018).

Todos os esteróides têm pressão de vapor muito baixa e valores de pKa relativamente altos (acima de 10). Com base nestes dados é possível dizer que os estrogênios são não voláteis, isto é, substâncias altamente lipofílicas que podem ser absorvidas em sólidos em matrizes ambientais. No entanto, quando os estrogênios são excretados por mamíferos, a via primária é através da formação de ácido glucorônico ou conjugados de sulfato. Esteróides conjugados são 10-50 vezes mais solúveis que os estrogênios principais (Gonschorowski, 2013).

Com isso, os contaminantes emergentes podem estar presentes em diferentes compartimentos ambientais, sendo de fundamental importância o estudo

abrangente de uma região para quantificação destes no meio e estudos toxicológicos que permitam avaliar efeitos agudos e crônicos destes compostos a variados organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos (Desbiolles et al 2018). Sendo importante o apontamento e a diferenciação entre os efeitos observados de desregulação endócrina e os efeitos não específicos do sistema endócrino (Marty et al 2018). Faz-se assim necessário o estudo dos sedimentos de rios e praias e as rotas de contaminação de um ambiente e da biota. A Figura 2 representa um esquema das possíveis fontes de contaminação de sistemas naturais com interferentes endócrinos e as interações sofridas no meio.

Figura 2: Possíveis rotas de contaminação de sistemas aquáticos por desreguladores endócrinos.



Fonte: Campbell et al., 2006

### 1.3 Caracterização de sedimentos

O sedimento pode ser definido como o resultado das interações de todos os processos que ocorrem em um ecossistema aquático. Possuem grande capacidade de acumulação o que o torna um potencial contaminador das águas. Os compostos indicadores de contaminação ambiental encontrados no sedimento podem ser

orgânicos, como inseticidas e herbicidas ou inorgânicos como os elementos-traço. A concentração de elementos-traço no sedimento e sua distribuição vertical é um importante indicador da evolução de impactos antrópicos sobre o ambiente aquático.

Além disso, o sedimento é o ponto final de grande parte da carga poluidora que adentra o ambiente aquático e é na água próxima ao leito que os teores de oxigênio dissolvido podem, rapidamente, atingir teores limitantes à vida.

A biota presente em sedimentos desempenha um importante papel ecológico. Esta biota é componente essencial para o funcionamento dos ecossistemas aquáticos, atuando nos processos ecológicos de transferência de energia e de ciclagem de nutrientes. Além disso, tem papel na movimentação de contaminantes e nutrientes dos sedimentos por: 1) biorrevolvimento ou bioturbação, alteração física e química dos sedimentos promovido pelas populações que se enterram; 2) bioacumulação, em que a concentração corpórea de determinada substância tende a aumentar com o tempo de contato do organismo a ela; 3) transferência trófica ou biomagnificação, quando a concentração aumenta com o nível trófico; 4) biodegradação, quando há transformação, após ingestão, da substância pelos bentos; e 5) migração, quando o contaminante é transportado para outro sistema ou trecho do mesmo ambiente (CETESB 2012).

#### **1.4 Parâmetros de qualidade dos sedimentos**

O sedimento tem sido cada vez mais utilizado em estudos de avaliação da qualidade de ecossistemas aquáticos, por retratar condições históricas da influência de atividades antrópicas sobre esses ambientes, nem sempre detectáveis pelo uso de variáveis da água (CETESB, 2017). A presença de contaminantes no sedimento potencializa a transferência destes para a coluna d'água. A mobilização de contaminantes da fase sólida para a fase dissolvida pode ocorrer por meio do revolvimento do sedimento, por exemplo, em virtude do aumento da vazão e das chuvas ou por atividades que interfiram com o leito do rio como dragagens (seja de desassoreamento ou aprofundamento da calha), passagem de dutos, construção de pilares de sustentação de pontes, dentre outras atividades.

Índices de qualidade de água são adotados por diversas normativas para regulação e controle de lançamento de efluentes e captação de água para abastecimento. No entanto, os sedimentos são capazes de interferir nas trocas e interações de espécies químicas com a coluna d'água e a biota residente, podendo afetar o ecossistema, os recursos naturais e a saúde humana (USEPA, 2005) e ainda são negligenciados. A CETESB, a partir de 2002, reconheceu a importância dos estudos de controle e qualidade dos sedimentos, estabelecendo assim uma rede de monitoramento para este compartimento ambiental em rios e reservatórios do Estado de São Paulo. Este relatório, no entanto, apenas se baseia nos resultados das variáveis analisadas e interpretadas de acordo com os critérios de avaliação da qualidade dos sedimentos, que estão representados na Tabela 3. Ainda há um longo caminho a ser trilhado para que o monitoramento de sedimentos seja consolidado em todas as regiões. Vale ressaltar que esta companhia já estabeleça a detecção de estrogenicidade para amostra de água, no entanto este parâmetro ainda não foi atribuído para amostras de sedimento.

Tabela 3 – Variáveis utilizadas para a avaliação da qualidade dos sedimentos.

Variáveis			
Física	Química	Toxicológica	Hidrobiológica
Granulometria; Série de resíduos; Umidade	Inorgânicas: Al, As, Cd, Pb, Cu, Cr, Fe, Mn, Hg, Ni, Zn Orgânicas: PAHs e Pesticidas organoclorados	Bioensaios: Ensaios ecotoxicológicos com <i>Hyalella azteca</i> ; Ensaio de mutagenicidade (Teste de Ames); e Ensaio de toxicidade aguda com <i>Vibrio fischeri</i>	Estrutura da comunidade bentônica

Fonte: CETESB, 2008.

Têm-se estes parâmetros como base para o monitoramento da qualidade do sedimento. No entanto outros fatores, como teor de matéria orgânica, pH, salinidade, temperatura, fatores climáticos e sazonais, potencial de oxi-redução e presença de comunidade microbiana, também são importantes para o estudo da dinâmica de contaminação dos sedimentos (Majumder; Das, 2016).

Os valores de granulometria podem indicar a capacidade do sedimento em adsorver contaminantes, sendo que grãos menores tendem a maior adsorção. Esta variável ainda ser faz importante na questão do estudo da hidrodinâmica do local, fator que interfere no grau de concentração de contaminantes e na mobilidade destes no meio aquoso, favorecendo ou não a sedimentação pelágica (Moraes

2010). A quantificação do teor de umidade em sedimentos está diretamente ligada ao potencial de dissolução de íons e capacidade de troca catiônica, sendo influenciado também pelo pH.

O teor de matéria orgânica se associa ao pH no que tange o grau de decomposição dos orgânicos presentes na matriz, sendo a decomposição em grupamentos funcionais mais ácidos (fenóis e ácidos carboxílicos) o que acarreta a medição de pH mais baixos (Rebouças et al, 2006). Além disso, a matéria orgânica pode caracterizar os sedimentos como mais orgânicos ou não, sendo valores superiores a 10% expressivos de sedimentos orgânicos. Uma grande quantidade de MO, associada aos baixos valores de pH e altos teores de umidade, pode indicar a presença de substâncias húmicas, as quais têm a capacidade de complexar compostos orgânicos e metais presentes no meio aquático (Antunes, 2008). Segundo Aiken et al. (2011), na última década os estudos apontaram que a matéria orgânica dissolvida atua no ciclo biogeoquímico dos metais. Devido às suas propriedades coloidais, a matéria orgânica desempenha importante papel na retenção dos metais (Citeau, 2004), o que foi constatado por Ekengle et al. (2017) ao avaliarem amostras de sedimento. Este comportamento pode ser comparado ao comportamento dos hormônios, uma vez que estes poluentes possuem uma grande afinidade com matéria orgânica.

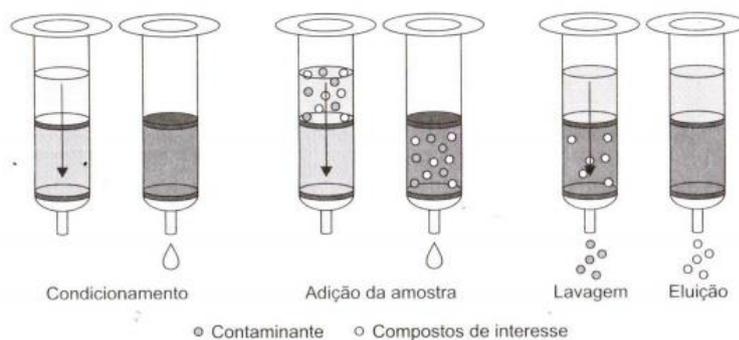
A complexidade de análise desta matriz se dá devido a esta diversidade de fatores que influenciam na adsorção de contaminantes os sedimentos. Desta maneira, estudos prévios demonstraram a presença de interferentes em análises cromatográficas, ecotoxicológicas e de potencial estrogênico (Santos, 2017; Santos, 2013; Ferreira, 2016; Cunha, 2017). Os organismos vivos apresentam diferentes mecanismos de resposta frente aos contaminantes aos quais são expostos, com isso os *endpoints* já estabelecidos nos ensaios ecotoxicológicos podem mostrar falsos negativos. Desta forma, faz-se necessário avaliar a resposta adequada de cada ensaio para matrizes que tem um comportamento complexo, com diversidade de contaminantes. O ensaio de atividade estrogênica utilizado pelos autores foi o ensaio *in vitro* YES, o qual faz uso de uma levedura geneticamente modificada que é capaz de detectar compostos que se liga ao receptor estrogênico, o que é tido como uma resposta de desregulação do sistema endócrino humano. Esta levedura quando exposta aos extratos de sedimentos apresentaram inibição de seu crescimento,

sendo assim expressa uma resposta de citotoxicidade da amostra ao organismo usado no ensaio. em matriz de sedimento apresentaram dificuldades na quantificação de atividade estrogênica através do ensaio YES devido ao aparecimento de citotoxicidade, mascarando assim o efeito estrogênico das amostras. Nos ensaios cromatográficos, a matriz sedimento apresenta interferentes que prejudicam a quantificação dos compostos de interesse, pois existe uma coeluição dos analitos de interesse com os interferentes. Tendo em vista estas limitações, o presente estudo teve como proposta realizar um estudo de caracterização prévia das amostras de sedimento para que as respostas dos ensaios fossem correlacionadas com as características da matriz e pudessem sofrer um tratamento prévio adequado.

### **1.5 Métodos de extração de sedimentos**

A extração em fase sólida (EFS) é uma técnica de separação que utiliza uma coluna aberta confeccionada por uma fase estacionária, ou fase sólida (disposta em um cartucho) que retém os analitos de interesse os quais são posteriormente eluídos com auxílio de solventes. Um cartucho típico é formado por um tubo de polipropileno contendo cerca de 50 a 500 mg do material sorvente, com 40-60 µm de tamanho de partícula, fixado em tubo através de dois filtros (Queiroz, 2011). A eficácia desta metodologia tem sido expressa em trabalhos acadêmicos (Sanson, 2012; Gonschorowski, 2007). Os mecanismos da extração em fase sólida (SPE) são: Condicionamento do cartucho; Concentração dos analitos; Isolamento do analito (clean-up); Isolamento da matriz; e Eluição dos analitos. A Figura 3 representa as etapas da extração em fase sólida.

Figura 3: Esquema das etapas de extração

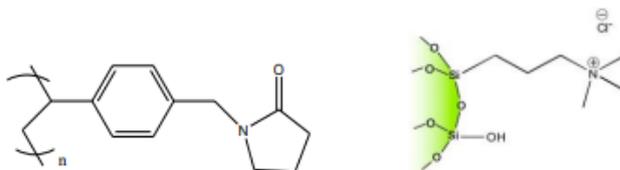


Fonte: Gonschorowski, 2007

Existe uma grande variedade de cartuchos aplicáveis para SPE, tendo como variação os mecanismos de separação. Estes variam pela da natureza do grupo ligado à sílica, ou do co-polímero, com isso a fase poderá ser apolar, polar ou trocador de íons. Os principais mecanismos de separação são: a adsorção, a partição (fase normal e fase reversa), troca iônica e exclusão por tamanho.

Neste trabalho foram utilizados o cartucho Strata-X e o Strata-SAX, sendo somente o primeiro submetido a etapa de eluição. O cartucho strata-x tem a capacidade de reter analitos polares e não-polares devido a sua composição de dois monômeros, um do grupo benzila e outro do grupo pirrolidona. O cartucho strata sax é caracterizado por realizar troca iônica sendo empregado para o isolamento de analitos de caráter ácido ou básico, presentes em soluções aquosas. Ele é composto por um sorvente capaz de reter ânions como ácidos orgânicos fortes e surfactantes, o trimetilaminopropilsilano. os compostos ácidos são retidos por trocadores de ânions. A Figura 4 representa os grupos ligantes dos cartuchos usados neste trabalho.

Figura 4: Grupo ligante do Strata X; Grupo ligante do Stratata SAX, respectivamente.



## 1.6 Ecotoxicidade

A ecotoxicologia é o ramo da toxicologia ambiental que trata do estudo dos efeitos nocivos provocados à biota decorrentes da exposição a agentes tóxicos (Azevedo, 2004). Abessa (2002) pontua a versatilidade dos ensaios ecotoxicológicos para conhecimento e monitoramento da qualidade de águas, sedimentos, solos e ar, sendo possível definir limites máximos permissíveis para lançamento de substâncias químicas e efluentes através da medição dos efeitos causados por ações antrópicas ao meio ambiente.

Os bioensaios têm o objetivo de expor organismos em laboratório a diferentes matrizes ambientais ou fortificadas com substâncias químicas para verificar os possíveis efeitos biológicos destes contaminantes aos organismos expostos ou às populações futuras.

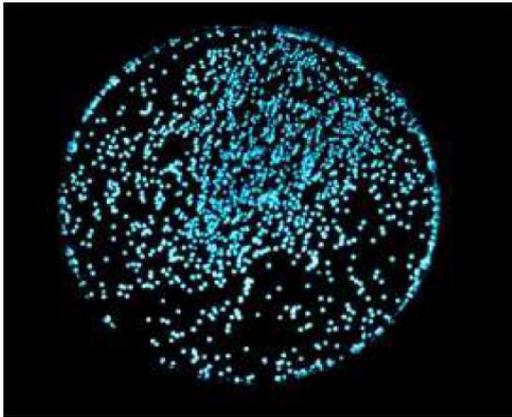
Os ensaios de toxicidade estão contidos no diagnóstico da qualidade ambiental e no controle da poluição. Estes podem apresentar grandes variações quanto à facilidade de execução e sua duração. Em período curto de tempo, são avaliados na toxicidade aguda os efeitos sofridos pelos organismos-teste, sendo eles a mortalidade e a imobilidade dos indivíduos.

Além do índice de morte, os organismos podem sofrer anomalias ou aparecimento de tumores, alterações na taxa de reprodução, comprimento e massa corporal, dentre outros problemas fisiológicos e até mudança comportamental, como falta de reação a um estímulo (Zagatto e Bertolotti, 2008).

No caso do ensaio agudo com a bactéria marinha bioluminescente (Figura 5), *Vibrio fischeri*, a inibição ou estímulo de produção de luz também é um critério de medição de efeito, uma vez que a inibição de luz não está necessariamente atrelada à morte do organismo.

A eficiência dos ensaios de ecotoxicidade com o organismo-teste *Vibrio fischeri* já foi exaustivamente comprovada por pesquisas internacionais, e suas inúmeras vantagens – boa reprodutibilidade, rapidez e simplicidade de sua execução – fizeram com que vários países desenvolvidos adotassem o seu uso (Rosa et al 2016).

Figura 5: Ilustração de *Aliivibrio fisheri*, organismo utilizado para teste de toxicidade



Fonte: <http://labs.medmicro.wisc.edu>

*Vibrio fischeri* é apenas uma das espécies de bactérias marinhas bioluminescentes. Muitos organismos do mar profundo dependem desta bactéria para gerar luz. Nesses casos, as bactérias vivem em colônias dentro do corpo de um hospedeiro, numa relação de mutualismo. Estas bactérias produzem luz através de uma reação química que se dá dentro das células. A *Vibrio fischeri* também existe como organismo livre, que se move através da água graças a um flagelo e se alimenta de matéria orgânica. Largamente utilizada como agente de oxidação de matéria orgânica em projetos de tratamento de efluentes, bem como é utilizada para monitoramento de toxicidade das águas em diversos meios.

*Vibrio fischeri* é uma bactéria gram-negativa e anaeróbia facultativa e sua luz natural é azul-esverdeada sob condições ambientais favoráveis e concentração de oxigênio superior a 0,5 mg/L. Quanto ao seu formato, as suas células são em forma de bastão e medem 0,003 mm, tendo sua predominância em nível mundial.

Os testes luminescentes podem ser aplicados para investigar a presença de toxicidade em amostras de águas, sedimentos ou solo, sendo muito utilizados para a detecção de toxicidade de efluentes. Os ensaios com bactérias luminescentes são usados para uma avaliação inicial dentro uma bateria de testes, em razão da maior velocidade de execução e a menores custos de manutenção. Caracterizados como microensaios, eles aplicam quantidades de amostras e reagentes na ordem de microlitros, o que permite as análises, além de menos espaço para a disposição dos materiais e instrumentação.

Após 30 anos de aplicação, os ensaios com *V. fischeri* encontraram grande aplicabilidade, principalmente com a padronização, em 1993, pelo DIN, norma 38412

parte 34, e em 1998 pela ISO norma 11348. Em 2006, a ABNT publicou a NBR 15411:2006 - "Ecotoxicologia aquática - determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Vibrio fischeri* (ensaio de bactéria luminescente)", que, baseada na ISO 11348, emprega o tempo de exposição de 30 minutos

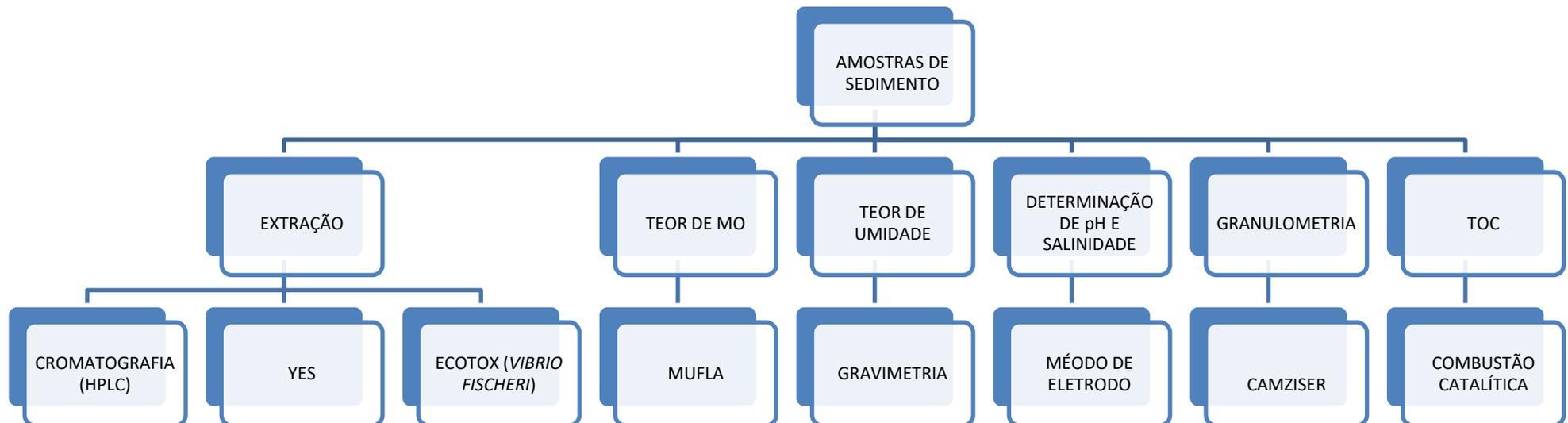
Contudo, todo ensaio possui a sua limitação, e como apontado por Souza (2018) o ensaio com este organismo-teste apresenta uma baixa sensibilidade em amostras que tenham amônia, o que pode ser frequente em amostras de sedimento, além disto, a variabilidade genética da bactéria e a necessidade do acondicionamento da bactéria liofilizada também são apontadas como desvantagem do método.

No entanto, pode-se constatar que há expressividade na utilização deste organismo para ensaios de ecotoxicidade com sedimentos, visto que existem metodologias replicáveis e normatizadas para tal.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado em duas diferentes fases, a primeira foi chamada fase teste, onde foi utilizado sedimentos-testes para determinação de metodologia adotada na fase seguinte. A segunda fase do trabalho foi a etapa experimental, onde foram coletadas amostras de sedimento em campo e estas foram submetidas a sucessivas análises. A **Erro! Fonte de referência não encontrada.** representa todas as etapas realizadas nesta fase do trabalho.

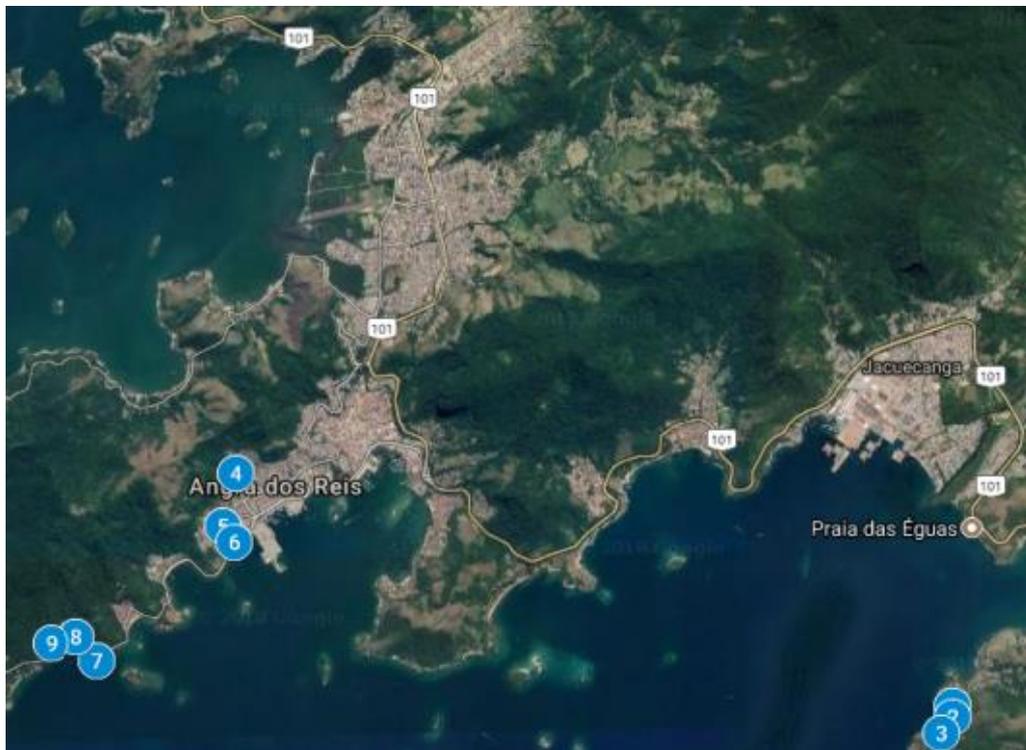
Figura 6: Esquema metodológico da 2ª fase do trabalho (etapa experimental)



## 2.1 Coleta e preservação

Os sedimentos da fase experimental foram coletados em três pontos em duas praias, praia Grande e praia da Biscaia, localizadas no município de Angra dos Reis, em dois períodos (Figura 7). A primeira campanha de coleta foi realizada na Primavera (outubro/2017), período com maiores índices pluviométricos; e a segunda coleta no Outono (abril/2019), período do ano no qual o clima está mais seco. Os pontos selecionados para coleta foram escolhidos por uma análise visual de acessibilidade e pontos de despejo de efluente das regiões. Foram utilizados frascos de vidro previamente descontaminados com uma sequência de solventes e água ultrapura (acetona, água do sistema Milli-Q e hexano) para a coleta da fração do sedimento usada na extração e detecção de contaminantes emergentes. A parte do sedimento para caracterização físico-química e ensaio ecotoxicológico foi coletada em recipiente plástico. O material coletado foi armazenado refrigerado em isopor até a chegada ao laboratório, onde foi transferido para uma geladeira (aproximadamente a 3°C) até realização das análises.

Figura 7: Mapa de localização dos pontos de coleta nas praias de Angra



Em todos os seis pontos descritos acima foi feita coleta de amostras de água. Houve ainda coleta de mais três pontos de água no rio do Choro, um curso hídrico

que recebe bastante aporte de efluente doméstico não tratado devido a ocupação urbana intensa em suas áreas de entorno.

## 2.2 Parâmetros físico-químicos

Para a caracterização físico-química dos sedimentos foram realizadas as análises de pH, salinidade, COT (carbono orgânico total), granulometria, teor de umidade e teor de matéria orgânica.

Para a análise de pH foi usada a metodologia adaptada descrita por Gastalho et al. (2009). O sedimento foi homogeneizado manualmente por 5 minutos com auxílio de espátula, separado 10g em um béquer, adicionado 25mL de água destilada e agitado por manualmente por 5 minutos. Após esperar 30 minutos para sedimentação, o pH foi medido na fase aquosa através de um eletrodo combinado de vidro da marca Quimis (modelo). A partir desta mesma alíquota foi medida a salinidade de cada ponto com uso de um refratômetro de salinidade, com os resultados expressos em ppm.

## 2.3 Teor de umidade

Os sedimentos foram analisados in natura, onde as cápsulas de porcelana foram secas na mufla por 30 minutos a 500°C, e posteriormente pesadas a fim de determinar a tara de cada um dos recipientes. Foi pesado 5g de sedimento e deixado a 105°C em estufa por 24 horas para garantir toda a remoção dos teores de água. Após este período, as cápsulas de cerâmica foram deixadas em dessecador por 30 minutos para que atingissem a temperatura ambiente pra a pesagem final. O teor de umidade em cada ponto foi calculado pela diferença de massa dos sedimentos antes e após o período na estufa, sendo calculado conforme a Equação 1:

$$TU (\%) = \left[ \frac{P-(C+S)}{S} \right] \cdot 100 \quad (1)$$

Onde: P – peso da amostra depois de aquecida a 105°C;  
C – peso da cápsula;  
S – massa de sedimento in natura

## 2.4 Matéria orgânica de sedimentos

A determinação do teor de matéria orgânica pelo método da mufla foi feita seguindo-se método estabelecido por Goldin (1987), com as seguintes modificações: secagem prévia das amostras em estufa a 105 °C, por um período de 24 h, visando eliminar toda a água presente nos resíduos, como a higroscópica, a capilar ou de cristalização (Rodella & Alcarde, 1994). Após esse período, os cadinhos de cerâmica com as amostras foram acondicionados em forno do tipo mufla e incinerados em uma temperatura de 550 °C, por 3 h.

Posteriormente, o conjunto (cadinho+resíduos) foi acondicionado em dessecador e, em seguida, pesado. O teor de matéria orgânica foi determinado em razão da perda de massa do resíduo incinerado, considerando-se o material perdido pela queima no intervalo de variação da temperatura de 105 °C a 550 °C, conforme a Equação 2:

$$MO (\%) = \left[ \frac{P-(T-C)}{P} \right] \cdot 100 \quad (2)$$

Em que: P = peso da amostra (g) depois de aquecida a 105 °C;

C = tara do cadinho (g); e

T = peso da cinza + cadinho (g).

## 2.5 Carbono orgânico total de sedimentos

A análise do C total dos resíduos foi feita por combustão seca em analisador marca Shimadzu, modelo SSM 5000A TOC, sendo as pesagens das amostras (1g) de cada resíduo realizadas em balança analítica, do nível "Classic", com precisão de pesagem de 0,00001 g. Os resíduos orgânicos utilizados foram macerados em almofariz; em seguida, foram secos em estufa a 65°C, durante 48 h, para retirar a umidade, antes da pesagem e análise no analisador TOC/SSM.

As amostras foram acondicionadas em cápsulas de porcelana, sendo, em seguida, incineradas em temperatura aproximada de 90°C, por 5 min, em um tubo de quartzo de combustão catalítica, sendo utilizado como carreador o gás O<sub>2</sub>, com 99,998 % de pureza. Após a combustão, toda a matéria orgânica foi convertida em CO<sub>2</sub> e um sensor infravermelho detectou a quantidade de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) gerado pela combustão, relacionando-a automaticamente com a quantidade de C elementar existente na amostra.

Na confecção de curva-padrão de C para o analisador automático, foram utilizadas amostras puras para análise de PHP (Potassium hydrogen phthalate, 47,05 % de C) e de sacarose (42,1 % de C).

## **2.6 Preparo de elutriato para o Sistema Microtox®**

Os sedimentos foram homogeneizados manualmente com auxílio de espátula por 5 minutos, posteriormente foi pesado o equivalente de 7g de massa seca (foi feito o desconto de teor de umidade anteriormente calculado) de cada um dos pontos de análise em um béquer, onde foram adicionados 35 mL da solução diluente do ensaio (NaCl 2%). Esta solução foi deixada em agitação orbital em mesa da marca Quimis a 1500rpm por 24 horas. O sobrenadante foi retirado e submetido ao ensaio com a bactéria bioluminescente, *Vibrio fischeri*.

## **2.7 Granulometria de sedimentos**

O ensaio de granulometria foi realizado no Laboratório de sedimentologia da Universidade Federal Fluminense com uso do equipamento analisador de distribuição de tamanho de partículas, o CAMSIZER da marca Macrolab.

O instrumento permite a medição simultânea de distribuição de tamanho de partículas, formato e parâmetros adicionais de grânulos e pós. A análise é baseada em mais de 60 imagens digitais por segundo, este tipo de medição permite mensurar partículas no intervalo de 30 µm a 30 mm, não sendo necessário utilizar mais de uma metodologia para medição.

Para o uso deste analisador, os sedimentos foram previamente lavados repetidamente com água corrente a fim de retirar toda a salinidade dos grãos. Após a retirada do sal, as amostras foram levadas a estufa (Nova Etica) a 55 °C por 24 horas, posteriormente foi realizado o quarteamento, onde essa fração foi depositada no equipamento para gerar os dados granulométricos. Os dados de diâmetro de partículas foram processado no Gradistat v4.0 para gerar a classificação dos pontos de sedimento.

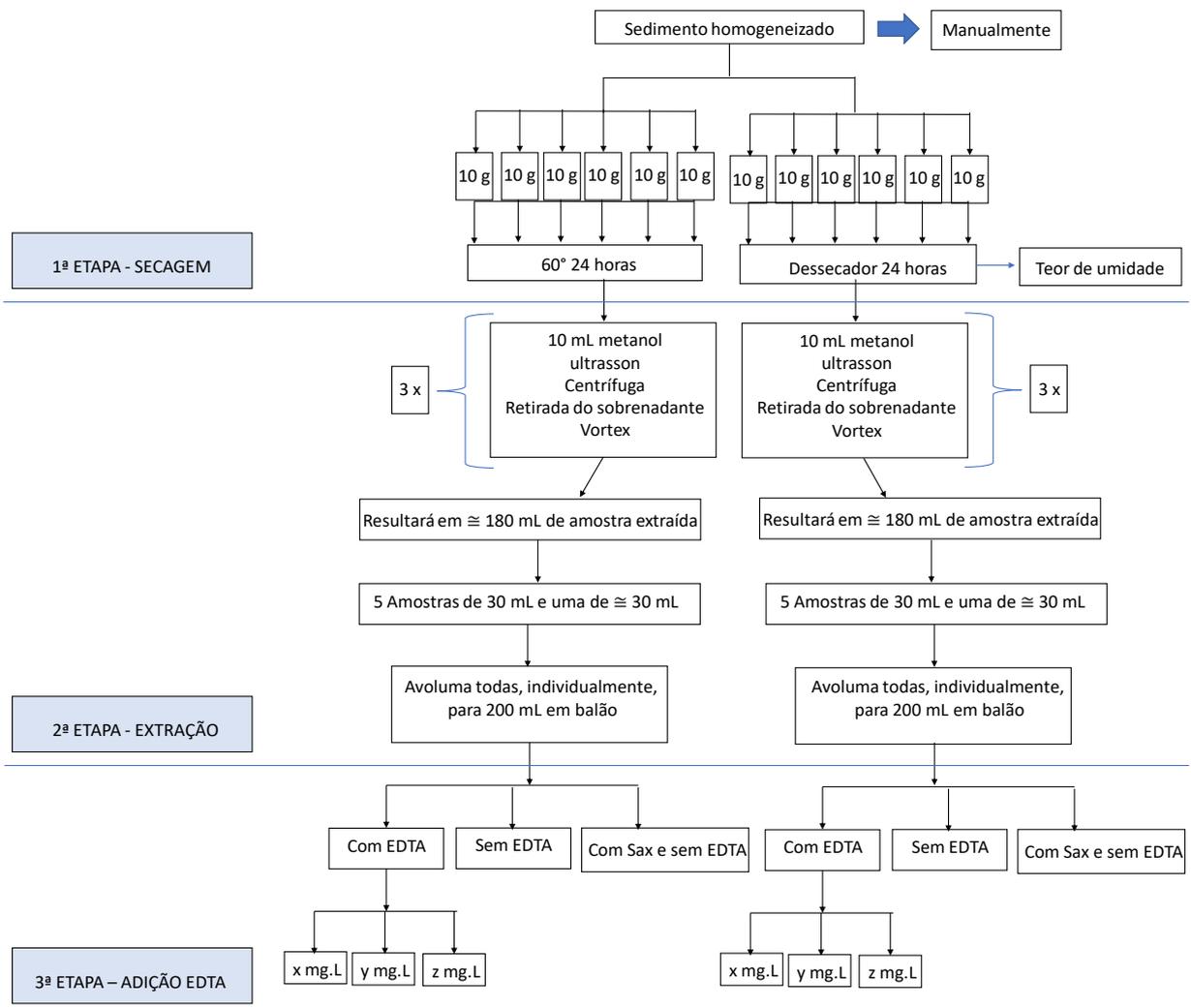
## 2.8 Extração dos sedimentos

Neste trabalho a etapa de extração dos sedimentos para análise dos contaminantes emergentes foi realizada em diferentes etapas. Estudos anteriores apresentaram interferentes nas análises de atividade estrogênica e cromatografia para as amostras de sedimento (Santos et al, 2016; Lima, 2017), mostrando que alguns compostos presentes nas amostras foram capazes de inibir o crescimento das leveduras utilizadas no ensaio de estrogenicidade.

A fim de evitar resultados falsos negativos, este trabalho inicialmente se propôs a realizar uma comparação inicial entre métodos de extração que visassem remover os interferentes desta complexa matriz e realizar uma melhor remoção de possíveis compostos que promovessem erros nos ensaios cromatográficos e de atividade estrogênica. Com isso, foram adotadas duas metodologias iniciais para otimização da extração em fase sólida. Nesta fase do trabalho foi usado um sedimento teste, previamente estudado com presença de metais, citotoxicidade quantificada pelo ensaio YES.

A Figura 8 é uma ilustração esquemática dos procedimentos adotados.

Figura 8: Esquema com as etapas de extração de sedimentos adotadas.



Na primeira etapa desenvolvida foram testadas duas formas de preparo do sedimento-teste, a primeira com a secagem da amostra em estufa a 60°C por 24 horas e a segunda com a secagem da amostra em dessecador por 24 horas. A premissa estudada a partir destas foi a possível volatilização dos compostos estrogênicos nas amostras de sedimento quando submetidas a temperaturas superiores a temperatura ambiente.

Na segunda etapa, foi testado o uso do solvente metanol e acetato de etila como extratores dos compostos de interesse da fase sólida para os extratos líquidos de análise. Esta etapa teve como objetivo identificar o solvente com maior

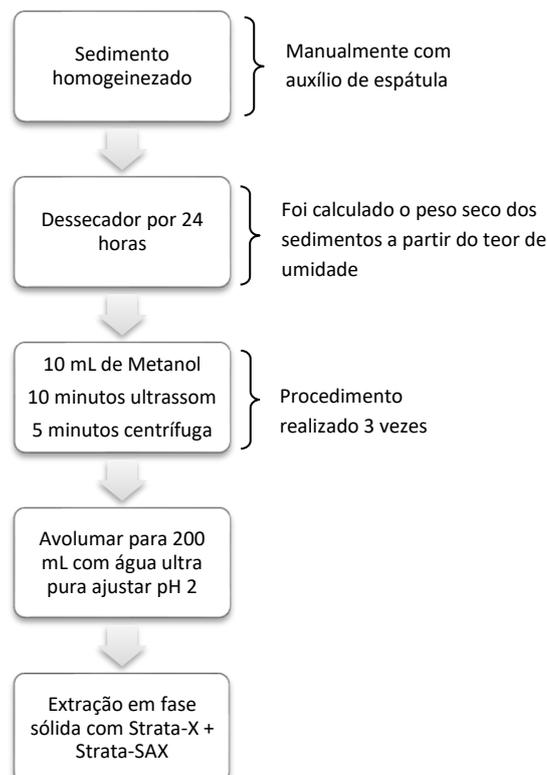
capacidade de solubilizar os microcontaminantes orgânicos dos grânulos de sedimento.

Já a última etapa teve como objetivo avaliar a presença de metais como possível fonte de citotoxicidade para a levedura *Saccharomyce cerevisiae* utilizada no ensaio de atividade estrogênica. Para isso foi feito o uso do quelante EDTA para retenção dos metais presentes no sedimento como uma etapa preliminar da extração em fase sólida. O uso do cartucho de limpeza Strata-SAX foi testado como uma segunda alternativa para uma remoção não específica de compostos que pudessem estar presentes nas amostras e fossem inibidoras do ensaio.

Os experimentos foram realizados em triplicata, a partir de uma mesma alíquota de sedimento-teste homogeneizado previamente e analisados em um mesmo momento para que fosse garantida a mesma manipulação em todas as diferentes vertentes.

Após essa etapa preliminar, os sedimentos coletados na área de estudo foram submetidos à seguinte sequência de extração, conforme representado na Figura 9.

Figura 9: Esquema representativo das etapas seguidas para extração dos sedimentos.



Após a etapa de extração em fase sólida o cartucho Strata-X foi eluído com Acetona sendo recolhido em frasco de vidro graduado e previamente descontaminado. O volume de acetona percolado no cartucho foi dividido em dois vials de igual volume, um para realização da cromatografia e outro para realização do ensaio YES. Cada um dos vials foi submetida à secagem em vácuo, sendo a massa seca ressuspensa em 1mL de etanol para a realização dos ensaios de atividade estrogênica – YES , e em 1mL de acetonitrila para a quantificação dos hormônios por cromatografia líquida de alta performance – CLAE/FLU.

Todo processo é realizado em Manifold sob vácuo a uma vazão de 3 mL/min em capela, a as etapas são descritas a seguir em ordem de execução:

- Condicionamento dos cartuchos: para os cartuchos Oasis HLB foram adicionados 6 mL de hexano, 2 mL de acetona, 6 mL de metanol e 10 mL de água ultra pura com pH 3 (ajustado com HCl);e, para os cartuchos de limpeza Strata SAX foram adicionados 10 mL de metanol e 10 mL de água ultra pura sem modificação do pH;
- Passagem da amostra pelos cartuchos: foi percolado um volume 200 mL da amostra com pH2 (ajustado com HCl);
- Eluição: 4 mL de acetona foram percolados pelo cartucho, removendo os analitos de interesse. O volume eluído foi seco em corrente de nitrogênio até evaporação completa;
- Ressuspensão: os analitos foram ressuspensados em 1 mL de etanol para determinação de atividade estrogênica pelo ensaio YES ou 1 mL de acetonitrila para análises cromatográficas(HPLC).

## **2.9 Dopagem dos sedimentos**

A etapa de dopagem dos sedimentos foi realizada para verificar a recuperação da metodologia adotada para cada fração dos sedimentos. Para isso, foi preparada uma solução de 10 mg Estradiol em 10 mL etanol. A partir desta solução mãe foi preparada uma solução de dopagem na concentração de 0,001 g.L<sup>-1</sup> Uma alíquota de 10 mL desta solução foi adicionada a 10 g sedimento e deixados em mesa agitadora orbital a 1500 rpm por 24 horas, tampados com parafilme. Os sedimentos foram deixados por 48 horas no dessecador para retirar a umidade restante e posteriormente foram submetidos aos procedimentos de extração por sonicação

seguida de centrifugação e à etapa de SPE com uso dos cartuchos Strata-X e Strata-SAX.

### **2.10 Ensaio de Atividade Estrogênica – YES**

O procedimento de análise pelo ensaio *in vitro* YES foi desenvolvido de acordo com a metodologia de Routledge e Sumpter (1996) com algumas modificações. As análises foram preparadas em capela de fluxo laminar e realizadas em microplacas de 96 poços incubadas em estufa a 30°C por 72 horas, e após este período é feita a leitura do ensaio, sendo possível a observação de alteração da coloração dos poços, de amarelo para rosa, caso haja atividade estrogênica na amostra analisada, em função da produção da  $\beta$ -galactosidase. E, há também aumento da turbidez nos poços, em virtude do crescimento da levedura.

Com o auxílio do espectrofotômetro (Softmax Pro 5, SpectraMax M3), foi realizado a leitura dos poços em cada placa em dois comprimentos de onda: 575 nm para cor e 620 nm turbidez. Para o cálculo dos resultados interpolou-se a curva das amostras com a do controle positivo 17 $\beta$ -estradiol e os resultados de atividade estrogênica foram expressos em equivalente estradiol (EQ-E2).

### **2.11 Cromatografia**

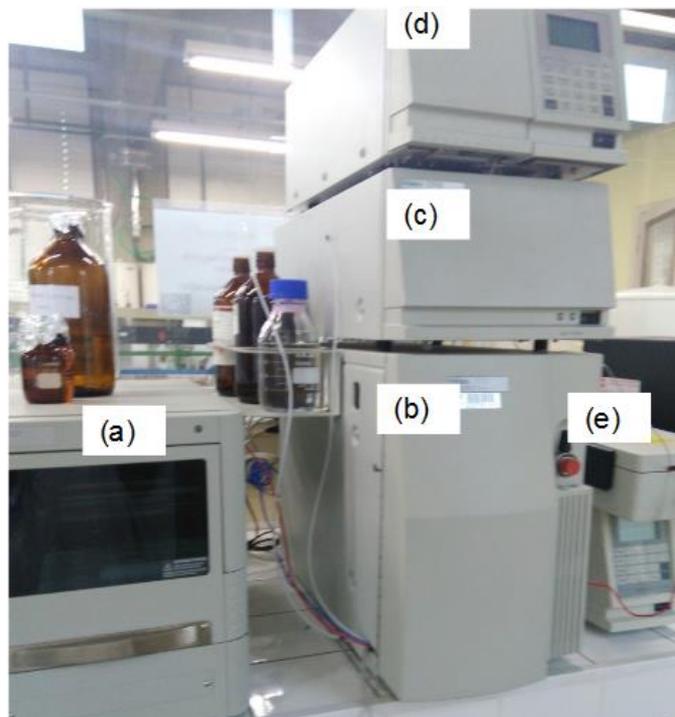
As substâncias avaliadas, 17 $\beta$ -estradiol (E2), 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2), estriol (E3) e bisfenol A (BPA) foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência em um cromatógrafo fabricado pela Waters Corporation®, Figura 10, utilizando detector de fluorescência com comprimentos de onda de emissão à 306 nm e excitação à 280 nm.

A coluna cromatográfica da Novapak PAH (4,6 x 250 mm, 5 micras) foi utilizada com temperatura de 30° C com auxílio do forno de colunas. O método utilizado para detecção e quantificação das substâncias foi baseado no trabalho de Oliveira (2015) e adaptações conforme apresentado por Silva(2016). As condições utilizadas foram fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup> de fase móvel em modo gradiente, variando a percentagem de acetonitrila (ACN) e água ultrapura, iniciando com 40% de ACN, mudando para 50 % em 6 minutos, 30 % em 9 minutos e 40% após 13 minutos até o tempo total de corrida de 15 minutos. As injeções foram realizadas com volume de 20  $\mu$ L, em triplicata, e a temperatura do mostrador foi fixada em 18°C.

A curva de calibração utilizada foi preparada através da injeção de uma solução padrão contendo as quatro substâncias avaliadas, E2, EE2, E3 e BPA, numa concentração que variou de 6,5 a 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (ppb) de cada composto. A linearidade foi obtida através da avaliação do valor de  $R^2$ , o limite de quantificação (LQ) foi obtido pela menor concentração da curva analítica e o limite de detecção (LD) foi obtido utilizando a Equação 3, sendo DP o desvio padrão referente à triplicata da menor concentração da curva analítica.

$$\text{LD} = \text{DP} \times 6,965 \quad (3)$$

Figura 10: Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência utilizado neste trabalho.



## 2.12 Ensaio de Ecotoxicidade

A análise de toxicidade foi realizada a partir do elutriado do sedimento. O organismo-teste selecionado para este estudo foi a bactéria bioluminescente *Vibrio fischeri*, por se mostrar compatível com a salinidade das amostras e devido a facilidade de reprodução do ensaio. A metodologia aplicada seguiu o descrito pela Norma ABNT NBR 15411-3 (ABNT, 2012).

No ensaio com a bactéria luminescente, foi utilizado o equipamento de incubação e fotômetro Microtox 500 (Figura 11), onde as amostras de elutriato foram

analisadas sem diluições em cubetas de borossilicato. Um volume 0,9 mL das amostras foi transferido para cubetas com 0,1 mL da solução de bactéria diluída, previamente medidas a luminescência.

Para medição do efeito de diminuição da emissão de luz das bactérias foi realizada a leitura no tempo zero de exposição (0 minutos), onde as bactérias não estavam em contato com a amostra, e em seguida no tempo de  $t=30$  minutos, sendo a bactéria exposta a concentração de 90% da amostra. Este decréscimo de luminescência é comparado ao controle com NaCl (2%) Para o controle negativo, foi utilizado o sulfato de zinco heptahidratado (3,42mg/L)Zn como substância de referência. Os resultados foram calculados a partir das respostas de 0 e 30 minutos através do software Microtox OMNI 4.1, gerando resultados e respostas expressas como a redução da bioluminescência da bactéria em cada amostra.

Figura 11: Equipamento Microtox M500



Fonte: Modern Water

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da primeira etapa do trabalho expressam os valores de equivalente estradiol (EQE2 –  $\text{ng.g}^{-1}$ ) quantificado em cada amostra de sedimento-teste utilizado com uso de quatro metodologias diferentes. Os resultados o ensaio de atividade estrogênica (YES) obtidos foram compilados e expostos na Tabela 4.

Tabela 4: Valores de equivalente estradiol para os sedimentos teste analisados para definição da metodologia.

	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	Média	Desvio	Citotoxicidade
<b>1A</b>	0.72	0.65	0.77	0.71	0.08	ND
<b>1B</b>	0.60	0.50	0.67	0.59	0.12	95.55%
<b>1C</b>	0.37	0.37	0.38	0.37	0.01	ND
<b>1D</b>	0.74	0.45	0.90	0.68	0.32	95.48%
<b>10A</b>	0.78	0.72	0.84	0.78	0.08	ND
<b>10B</b>	1.28	1.21	1.35	1.28	0.10	ND
<b>10C</b>	1.57	1.44	1.70	1.57	0.18	ND
<b>10D</b>	0.68	0.65	0.71	0.68	0.05	69.69%

Legenda: Os valores desta tabela estão expressos em ng de EQE2 por g de sedimento. ND – não detectado.

As siglas de metodologias adotadas na Tabela 4 são definidas da seguinte forma: “A” representa o uso do sedimento seco em dessecador por 24 horas, com adição de EDTA no extrato líquido, para remoção de metais, sendo submetido a SPE com uso de cartucho Strata X associado ao uso do cartucho Strata SAX; “B” representa o uso do sedimento seco em dessecador por 24 horas, com adição de EDTA, sendo submetido a SPE com uso apenas de cartucho Strata X; “C” representa o uso do sedimento seco em dessecador por 24 horas, sem adição de EDTA no extrato líquido, sendo submetido a SPE com uso de cartucho Strata X associado ao uso do cartucho Strata SAX. A Metodologia “D” é resultado da extração da amostra de sedimento sem nenhuma etapa de limpeza de matriz, ou seja, fez uso apenas da SPE com o cartucho STRATA-X.

Os resultados da Metodologia “C” corroboram a discussão sobre as limitações deste ensaio para a matriz sedimento, pois mostram valores elevados de citotoxicidade que interferem ou mesmo impossibilitam o cálculo do potencial estrogênico de uma amostra. Desta forma, o uso de métodos que visem a remoção

dos interferentes dessa matriz se faz indispensável. O resultado da Metodologia “A” mostrou que houve a remoção da citotoxicidade em ambos os pontos analisados. O uso do EDTA se mostrou relevante, uma vez que os resultados da Metodologia “B” evidenciam que a citotoxicidade não foi completamente removida, sendo assim possível desassociá-la da presença de metais nas amostras. O efeito do EDTA precisa ser melhor compreendido em novos ensaios com a finalidade de avaliar sua eficiência e seus efeitos nas amostras, como por exemplo se comportando como antagonista devido a resposta de valor de EQE2 menor do que na metodologia testada com o uso apenas do X+SAX. Não é coerente atribuir o uso deste quelante como fundamental para polimento da matriz sedimento. A metodologia “C” foi a que apresentou melhor custo-benefício, pois foi capaz de remover a citotoxicidade do ensaio, apresentou baixos índices de desvio padrão nas amostras analisadas e fez uso de menos insumos de preparo de amostra. Com isso os demais ensaios das fases seguinte desta pesquisa adotaram esta metodologia de preparo de sedimento para extração.

Na segunda fase do trabalho, foram realizadas coletas de água e sedimento em duas campanhas distintas. As amostras de água foram somente avaliadas quanto ao potencial estrogênico através do ensaio YES, nenhum outro parâmetro apontado para estudo neste trabalho foi analisado. Os resultados expostos na Tabela 5 representam os valores de EQE2 –  $\text{ng.L}^{-1}$  calculados para os nove pontos de coleta da primeira campanha, realizada em outubro de 2017.

Tabela 5: Resultado do ensaio YES para as amostras de água da primeira campanha de Angra.

	<b>1ª</b>	<b>2ª</b>	<b>3ª</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio</b>
<b>1</b>	2.4	2.3	2.5	2.4	0.1
<b>2</b>	5.0	4.8	5.2	5.0	0.3
<b>3</b>	1.9	1.9	2.0	1.9	0.1
<b>4</b>	23.3	24.1	22.3	23.2	1.2
<b>5</b>	33.7	31.5	35.7	33.6	2.9
<b>6</b>	31.6	31.2	32.0	31.6	0.6
<b>7</b>	0.8	0.8	0.8	0.8	0.0
<b>8</b>	0.9	0.9	0.9	0.9	0.0
<b>9</b>	0.8	0.8	0.8	0.8	0.0

Os resultados apresentados na tabela mostram que apesar de todos os pontos de coleta sofrerem com a contaminação por desreguladores endócrinos há uma notória variação quanto ao aporte que cada um destes ambientes recebe. Comparando os resultados obtidos das duas praias, Pontos 1 a 3 são da praia da Biscaia e pontos de 7 a 9 são da praia Grande, é possível observar que a praia da Biscaia apresenta maior presença de contaminação por desreguladores endócrinos do que a praia Grande. Ambas, recebem banhistas em épocas distintas do ano, no entanto a praia da Biscaia apresenta pontos onde não há um distanciamento das casas e comércios das águas do mar. Esta região possui um descarte direto de efluentes no mar, o que pode ter acarretado a detecção de valores mais elevados de EQE2. A praia grande possui uma faixa de areia mais extensa e visivelmente não apresentava pontos de despejo de efluentes. Estudos de correntes marítimas e dinâmica dos oceanos precisam ser efetuados para entender a distribuição dos contaminantes na região.

Vê-se, no entanto, que os valores mais expressivos desta tabela foram para os pontos coletados ao longo do rio do Choro, curso hídrico este que já sofreu grandes interferências antrópicas e é corpo receptor de grandes descargas de esgoto in natura proveniente das ocupações urbanas adjacentes. Pode-se esperar que estes contaminantes possam ser enxergados na análise dos sedimentos referentes aos mesmos pontos, uma vez que os compostos de interesse têm uma afinidade teórica maior com sólidos e matéria orgânica, no entanto não foi possível realizar a coleta dos sedimentos a longo deste rio.

As amostras de sedimento coletadas nas duas campanhas foram submetidas a todos os parâmetros de análise abordados neste texto. Os resultados físico-químicos da primeira coleta de Angra coleta realizada em Outubro de 2017 estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6: Resultado dos parâmetros físico-químicos das amostras de sedimento da primeira campanha.

N° do Ponto	Coordenadas do Ponto		Teor de umidade (%)	Matéria orgânica (%)	COT (mg/L)
1	-23,02974	-44,23576	14,08	0,75	
2	-23,03108	-44,23576	18,69	0,55	
3	-23,03270	-44,23713	19,17	0,57	
7	-23,02484	-44,33695	14,93	0,34	0,39
8	-23,02219	-44,33940	24,51	0,28	0,41
9	-23,02294	-44,34236	11,58	0,30	0,42

Os sedimentos coletados apresentaram baixos percentuais de matéria orgânica e carbono total. A granulometria destes pontos apresentou um teor de finos mais elevados para os pontos 1, 3, 8 e 9.

A partir da segunda etapa do trabalho, todos os sedimentos foram submetidos ao mesmo procedimento de extração para o ensaio de atividade estrogênica e de cromatografia, de acordo com o resultado obtido da primeira etapa. Os resultados de cromatografia e atividade estrogênica foram calculados levando em consideração a massa seca de sedimento usada na etapa da extração.

Os valores de EQE2 para esta campanha na matriz de sedimentos estão expressos na Tabela 7.

Tabela 7: Resultado de atividade estrogênica para as amostras de sedimento de Angra da primeira campanha.

Pontos	EQE2 (ng/g)			Média	Desvio	Citotoxicidade
	1°	2°	3°			
1	<LD	<LD	<LD	<LD		4%
2	<LD	<LD	<LD	<LD		14%
3	0.15	0.14	0.16	0.15	0.01	ND
7	<LD	<LD	<LD	<LD		ND
8	<LD	<LD	<LD	<LD		ND
9	<LD	<LD	<LD	<LD		ND

O resultado corrobora o encontrado para as amostras de água, onde a primeira praia apresentou maior teor de contaminação. No entanto dentre as amostras de sedimento os dois primeiros pontos coletados na primeira praia apresentaram citotoxicidade o que pode ter impossibilitado o cálculo da atividade

estrogênica da amostra. O uso do cartucho de limpeza SAX não foi suficiente para remover todos os compostos interferentes neste determinado caso. O terceiro ponto da praia Biscaia foi possível calcular o EQ. Os pontos da segunda praia apresentaram resultados abaixo do limite de detecção do ensaio, pode-se correlacionar com os resultados de baixo teor de matéria orgânica destes pontos, inferiores a 5%.

Em todos os pontos desta coleta analisados por HPLC não foi possível quantificar nenhum dos compostos (E2, EE2, BPA), pois em alguns casos os valores ficaram abaixo do limite de detecção e quantificação do método e em outros os ruídos provocados por interferentes impossibilitaram a quantificação na curva analítica.

A segunda campanha foi realizada em abril de 2019, e todos os sedimentos foram submetidos às análises descritas neste trabalho. Os dados das águas coletadas na segunda campanha não foram analisados a tempo de concluir este estudo. Os resultados dos parâmetros físico-químicos dos sedimentos coletados em abril de 2019 estão relacionados na Tabela 8.

Tabela 8: Resultado dos parâmetros físico-químicos das amostras de sedimento da segunda campanha.

<b>Nº do Ponto</b>	<b>Coordenadas do Ponto</b>		<b>Teor de umidade (%)</b>	<b>Matéria orgânica (%)</b>	<b>pH</b>
1	-23,02974	-44,23576	16,38	0,91	7,16
2	-23,03108	-44,23576	22,98	0,9	7,42
3	-23,03270	-44,23713	23,71	0,91	7,71
7	-23,02484	-44,33695	17,55	0,96	8,32
8	-23,02219	-44,33940	32,48	0,95	7,31
9	-23,02294	-44,34236	13,1	0,96	7,43

Os pontos 7 e 8 da praia Grande foram caracterizados como areia grossa, enquanto o ponto 9 foi tido como moderadamente grossa. Os pontos de sedimento da praia Grande foram classificados como moderadamente grossa, areia, areia grossa, respectivamente sendo eles os pontos 1, 2 e 3. Houve uma variação sazonal nos percentuais de matéria orgânica destes pontos, sendo nesta segunda campanha os sedimentos mais orgânicos que na primeira.

Os resultados do ensaio YES estão representados em valores de EQE2 para esta segunda campanha na matriz de sedimentos na Tabela 9.

Tabela 9: Resultado de atividade estrogênica para as amostras de sedimento de Angra da segunda campanha.

Pontos	EQE2 (ng/g)					Citotoxicidade
	1°	2°	3°	Média	Desvio	
55	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	ND
56	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	27%
57	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	ND
61	4.8	3.8	5.6	4.7	1.3	ND
62	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	ND
63	2.1	2.0	2.2	2.1	0.15	ND

Os resultados de ecotoxicidade do elutriato dos sedimentos expostos a bactéria mostrou que não houve toxicidade aguda das amostras expressos em concentração de efeito em 50 % dos organismos com o tempo de exposição de 30 minutos.

No entanto, Jaques et al (2016) fizeram um trabalho comparativo deste bioensaio a partir da exposição direta do organismo-teste aos sedimentos com os elutriatos destes mesmos pontos coletados em rios da República Tcheca. Neste trabalho, constataram que o ensaio apresenta limitação na resposta quando há o preparo de elutriato, pois os valores de toxicidade com o uso direto dos sedimentos apresentam valores mais expressivos. Este fato pode acarretar em resultados falsos negativos de ecotoxicidade. Desta maneira, os autores inferem que a extração prove perdas de contaminantes. Os autores afirmam haver uma alta correlação de teor de carbono orgânico total com a toxicidade de uma amostra.

Outro estudo elaborado por Romano et al (2019) analisou a toxicidade de elutriatos de sedimentos marinhos com frações grosseiras de granulometria (predominantemente areia) e baixos percentuais de carbono orgânico total nas amostras. Os autores também obtiveram resultados conflitantes de toxicidade, mostrando que mesmo os pontos com presença de metais pesados o elutriato não permitiu o cálculo da ecotoxicidade em CE 50% por não promoveram o decréscimo de bioluminescência da bactéria.

As amostras de sedimento que possuem altos níveis de contaminação por metais podem provocar aumento na incidência de luz emitida pelas bactérias, sendo

este uma problemática na elaboração de laudos de ecotoxicidade para áreas contaminadas (Baran e Tarnawski, 2013).

Com isto, fica aparente que mais estudos precisam ser realizados para que se consiga correlacionar as características que promovem essa interferência nos resultados, visto que existem 7 trabalhos científicos indexados com a temática (palavras-chave de busca: “elutriato”; “sedimento”, “vibrio fischeri”) nos últimos 8 anos. Sendo necessário ainda avança nos resultados comparativos de exposição direta do sedimento quando comparado ao preparo de elutriatos, precisando ainda estabelecer parâmetros de correlação entre ambas as respostas.

## 4 CONCLUSÃO

Aos sedimentos e águas das praias Grande e da Biscaia apresentaram potencial estrogênico medido através do ensaio YES. Desta maneira a região apresenta um aporte de contaminantes emergentes que pode vir a representar um efeito para a população exposta

O estudo mostrou as limitações analíticas para o estudo das matrizes ambientais, principalmente os sedimentos. Os resultados de cromatografia apresentaram muitos interferentes, o que pode ter interferido na quantificação dos compostos de interesse.

A aplicação da etapa de preparo e limpeza das matrizes ambientais se mostrou importante para a remoção de interferentes, principalmente para a remoção da citotoxicidade do ensaio YES. O uso do cartucho Strata-SAX foi satisfatório, porém não obteve sucesso em 100% das amostras estudadas.

Ensaio de ecotoxicidade com bactéria *Vibrio fischeri* não se mostrou adequado para elutriatos de praias, uma vez que apresentou valores de estímulo de luminescência nos pontos analisados. Outros estudos com a exposição direta deste organismo-teste aos sedimentos *in natura* precisam ser realizados para um diagnóstico ecotoxicológico mais representativo.

A importância dos parâmetros físico-químicos dos sedimentos precisa ser melhor estudada, bem como a dinâmica dos ambientes aquáticos para um melhor entendimento da distribuição e ação dos contaminantes emergentes, em especial os desreguladores endócrinos.

## REFERÊNCIAS

- ABESSA, D.M.S. **Avaliação da qualidade de sedimentos do sistema estuarino de Santos, SP, Brasil**. 2002. Tese (doutorado) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ABNT, NBR 15411-3, Ecotoxicologia Aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras aquosas sobre a emissão de bioluminescência de *Vibrio fischeri*, Rio de Janeiro, 2012.
- ADEEL, M., Song, X., Wang, Y., Francis, D., Yang, Y. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. **Environment International**. v. 99, p. 107-119, 2017.
- ANDALURI, Gangadhar; SURI, Rominder PS; KUMAR, Kuldip. Occurrence of estrogen hormones in biosolids, animal manure and mushroom compost. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 184, n. 2, p. 1197-1205, 2012.
- BELHAJ, Dalel et al. Fate of selected estrogenic hormones in an urban sewage treatment plant in Tunisia (North Africa). **Science of the Total Environment**, v. 505, p. 154-160, 2015.
- BILA, Daniele Maia; DEZOTTI, Márcia. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Química nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.
- BARAN, A., Tarnawski, M. Phytotox kit/Phytotest kit and Microtox® as tools for toxicity assessment of sediments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 98, p. 19-27. 2013.
- BRASIL, Resolução n. 430, de 13 de maio de 2011. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução n. 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA.
- CAMPBELL, Chris G. et al. 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.

CARREIRA, R. et al. Distribuição de Coprostanol ( $5\beta(H)$ -coleston- $3\beta$ -ol) em Sedimentos Superficiais da Baía de Guanabara: Indicador da poluição recente por esgotos domésticos. **Química Nova**, Vol. 24, No. 1, p. 37-42, 2001.

CETESB (São Paulo) Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo 2014. [recurso eletrônico] / CETESB. - - São Paulo : CETESB, 2015. 2 arquivos de texto (540 p. em 2 partes) : il. color., PDF ; 65 MB. - - (Série Relatórios / CETESB, ISSN 0103-4103.

CETESB, Índices de qualidade das águas, Apêndice C, 29 p., 2013.

DARBRE, Philippa D. (Ed.). **Endocrine disruption and human health**. Academic Press, 2015.

DARBRE, Philippa D. The history of endocrine-disrupting chemicals. **Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research**, v. 7, p. 26-33, 2019.

DE OLIVEIRA, Milina et al. Pharmaceuticals residues and xenobiotics contaminants: occurrence, analytical techniques and sustainable alternatives for wastewater treatment. **Science of The Total Environment**, v. 705, p. 135568, 2020.

DESBIOLLES, F., Malleret, L., Tiliacos, C., Wong-Wah-Chung, P., Laffont-Schwob, I. Occurrence and ecotoxicological assessment of pharmaceuticals: Is there a risk for the Mediterranean aquatic environment? **Science of the Total Environment**. v. 639, p. 1334-1348, 2018.

EUROPEAN COMMISSION. European Green Capital. Green cities – fit for life. 2012. Disponível em: [http://ec.europa.eu/environment/europeangreencapital/wp-content/uploads/2012/07/Copenhagen-Short-Leaflet\\_Web.pdf](http://ec.europa.eu/environment/europeangreencapital/wp-content/uploads/2012/07/Copenhagen-Short-Leaflet_Web.pdf) Acessado 08/08/2017.

FRANCISCO, C.N. **Subsídios à gestão sustentável dos recursos hídricos no âmbito municipal: o caso de Angra dos Reis, RJ**. 2004. Tese (Doutorado) – PPG-GEO, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, 2004.

GASTALHO, C.; BARREIROS, I.; RIBEIRO, V. 2009. Determinação do pH e acidez de uma amostragem solo. Universidade de Coimbra. Licenciatura em Ciências Bioanalíticas, Hidrologia e Edafologia, 13p.

GHISELLI, Gislaine. **Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal**

(PFHP). 2006. 211p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP.

GONSCHOROWSKI, Graciele Pereira da Cruz. **Caracterização química de hormônios sexuais em águas de poço da região da USP via cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas CG/EM**. 2013. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

INEA – Diagnóstico do Setor Costeiro da Baía da Ilha Grande – Subsídios à Elaboração do Zoneamento Ecológico-Econômico Costeiro Volume I ZEEC 2015

INEA, Boletim Consolidado de Qualidade das Águas da Região Hidrográfica V - Baía de Guanabara, Bacia da Baía de Guanabara, Resultados Referentes ao ano de 2015.

INEA, Boletim de Qualidade das Águas da Região Hidrográfica V - Baía de Guanabara, outubro de 2016,

JARQUE, S., MASNER, P., KLÁNOVÁ, J., PROKEŠ, R., BLÁHA, L. Bioluminescent vibrio fischeri assays in the assessment of seasonal and spatial patterns in toxicity of contaminated river sediments. **Frontiers in Microbiology**. v. 7, Article number 1738, 2016.

KABIR, Eva Rahman; RAHMAN, Monica Sharfin; RAHMAN, Imon. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 40, n. 1, p. 241-258, 2015.

K'OREJE, Kenneth Otieno et al. Occurrence and treatment of contaminants of emerging concern in the African aquatic environment: Literature review and a look ahead. **Journal of environmental management**, v. 254, p. 109752, 2020.

MA, Li; YATES, Scott R. A review on structural elucidation of metabolites of environmental steroid hormones via liquid chromatography–mass spectrometry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 109, p. 142-153, 2018.

MAJUMDER, S. P.; DAS. A. C. Phosphate-solubility and phosphatase activity in Gangetic alluvial soil as influenced by organophosphate insecticide residues. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 126, p. 56-61, 2016.

MARTY, M.S., BORGERT, C., COADY, K., GREEN, R., LEVINE, S.L., MIHAICH, E., ORTEGO, L., WHEELER, J.R., YI, K.D., ZORRILLA, L.M. Distinguishing between endocrine disruption and non-specific effects on endocrine systems. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. V. 99, P. 142-158, 2018.

MORAES, M. A., **Estudo geoquímico, ecotoxicológico e ecológico do sedimento nas proximidades de um poço de perfuração na bacia de campos, Rio de Janeiro, Brasil**. 2010. 157f. Dissertação (Mestrado em Geociências - Geoquímica Ambiental) -Universidade Federal Fluminense.

OLIVEIRA, M. M., **Monitoramento de desreguladores endócrinos no rio Arroio Fundo na Bacia de Jacarepaguá, RJ**. 2015. 123f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – PAMB/UERJ – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2015.

PAL, Amrita et al. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. **Science of the total environment**, v. 408, n. 24, p. 6062-6069, 2010.

PESSOA, Germana P. et al. Occurrence and removal of estrogens in Brazilian wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v. 490, p. 288-295, 2014.

REBOUÇAS, A. C. “Água Doce no Mundo e no Brasil”, In: REBOUÇAS, A. C., BRAGA, B., TUNDISI, J. G. (Org.), **Águas Doces no Brasil: Capital Ecológico, Uso e Conservação**, 3a ed., São Paulo – SP, Editora Escrituras. 2006.

REIS FILHO, Ricardo Wagner; ARAÚJO, Juliana Coutinho de; VIEIRA, Eny Maria. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 817-822, 2006.

ROMANO, E., BERGAMIN, L., PIERFRANCESCHI, G., MAGGI, C., BERDUCCI, M.T., AUSILI, A. Conflicting outcomes of an integrated approach to sediment quality assessment in a Sardinian coastal area subjected to mining activities. **Journal of Soils and Sediments**. 2019.

ROSA, Danielle Silva da; SILVA, Luiz Alessandro da; WALTRICK, Sandra Ap. Müller. *Vibrio fischeri*: Uma abordagem prática através da Biotecnologia. **Revista Maiêutica, Indaial**, v. 4, n. 1, p. 15-20, 2016.

SANT'ANNA Jr., G.L., Tratamento biológico de efluentes: fundamentos e aplicações, Editora Interciência, Rio de Janeiro, 2013.

SCHÄFER, Andrea I.; AKANYETI, Ime; SEMIÃO, Andrea JC. Micropollutant sorption to membrane polymers: a review of mechanisms for estrogens. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 164, n. 1-2, p. 100-117, 2011.

SILVA, L. L. S., **Utilização de UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e osmose inversa para remoção de estrogênios presentes em esgoto sanitário biotratado**, 2016. 164f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, EQ/UFRJ, Rio de Janeiro, 2016.

SNIS. SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES SOBRE SANEAMENTO (SNIS). Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos. Brasília, 2011, 432 p.

SOLOMON, Gina M.; SCHETTLER, Ted. Environment and health: 6. Endocrine disruption and potential human health implications. **Cmaj**, v. 163, n. 11, p. 1471-1476, 2000.

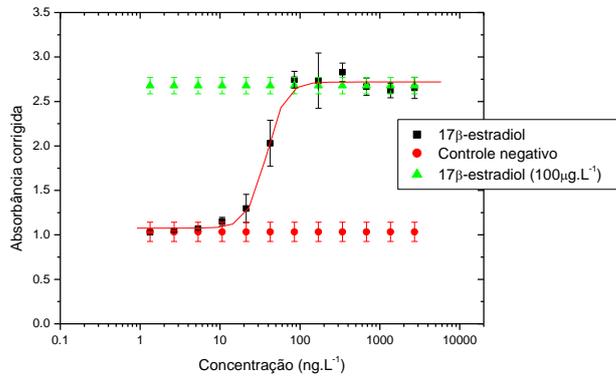
WASHINGTON. United States Environmental Protection Agency. Guidelines for Water Reuse. 2012. Disponível em: <<https://nepis.epa.gov/Adobe/PDF/P100FS7K.pdf>> Acessado em: 05.09.2016

WEISHAAR, J.L., Aiken G.R., Bergamaschi B.A., Fram M.S., Fujii R., Mopper K. Evaluation of specific ultraviolet absorbance as an indicator of the chemical composition and reactivity of dissolved organic carbon. **Environmental Science & Technology**. V. 37, p.4702–4708, 2003.

WHO. World Health Organization. Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater. Vol. 1. Policy and regulatory aspects. 2006. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9241546824\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9241546824_eng.pdf)> Acessado em: 05.09.2016.

ZAGGATO, P. A., BERTOLETI, E. Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações. Rima, São Carlos, SP, 472 p., 2008.

## ANEXO



Parameter	Value	Error
Chi <sup>2</sup> /DoF	0.00624	
Initial(A1)	1.07558	0.04089
Final (A2)	2.7188	0.03441
EC50 (x0)	37.85198	2.15807
Power (p)	3.65717	0.73545

