

**COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**

**EDITAL INTERNO Oportunidade de Nucleação de novos Projetos de Pesquisa –
DPDE/IPEN Nº 4/2017**

Programa 5 - MEIO AMBIENTE Atividade 510 - Química Ambiental

**INVESTIGAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DA QUALIDADE DAS ÁGUAS
SUPERFICIAIS NO ESTADO DE SÃO PAULO QUANTO À PRESENÇA DE
HORMÔNIOS E PRAGUICIDAS**

COORDENADOR: DR. JOSE ROBERTO ROGERO

Maio – 2017

1. Identificação da proposta

As águas superficiais incluem córregos, rios, lagos e reservatórios. Os seus ecossistemas associados fornecem habitat a muitas espécies vegetais e animais, e está associada à qualidade do ar e outros fatores ambientais. Considerando as matrizes aquáticas, as águas superficiais estão bastante susceptíveis às ações antrópicas, via descarte de esgoto doméstico e industrial, habitação inadequada em margens de rios e reservatórios, e muitas vezes por serem utilizadas como um local para descarte de lixos. Além da ação antrópica, as águas superficiais também estão associadas com alterações climáticas.

Nesse contexto, torna-se imprescindível que seja uma matriz constantemente estudada, e para que haja melhoria na qualidade das águas superficiais, estudos têm sido propostos para sugerir valores orientadores quanto à compostos não legislados, também conhecidos como contaminantes emergentes.

Segundo a USEPA, contaminantes emergentes são “poluentes (bióticos e abióticos) 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 em vários compartimentos ambientais”(USEPA, 2011).

As concentrações de contaminantes emergentes em ambientes aquáticos naturais são, geralmente, muito baixas, situando-se na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} . Nesses níveis de concentrações, torna-se evidente a necessidade de técnicas analíticas com baixo limite de detecção/quantificação para identificar a presença dessas substâncias. Dentre os contaminantes emergentes conhecidos, incluem-se os interferentes endócrinos, compostos hormonalmente ativos, com capacidade de causarem alterações no sistema endócrino de seres vivos (humanos e não-humanos) mesmo que em baixas concentrações.

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

O início da problemática com os interferentes endócrinos se dá quando pequenas moléculas possuem a capacidade de mimetizá-los, comprometendo assim os processos fisiológicos do organismo. A interação hormônio-receptor pode ocorrer de duas maneiras:

1. Agonista, quando uma molécula hormonal se liga a um receptor provocando uma resposta que desencadeará um efeito biológico; ou
2. Antagonista, quando um hormônio se liga ao receptor bloqueando a ação antagonista de outro hormônio.

De acordo com Birkett e Lester (2003) as perturbações no sistema endócrino causadas pelos interferentes endócrinos (IE) são: mimetização de hormônios naturais,

estímulo da formação de mais receptores hormonais, bloqueio de sítios receptores em uma determinada célula, aceleração da síntese e excreção de hormônios e na desativação de enzimas responsáveis pela secreção de hormônios e/ou destruindo a habilidade dos hormônios de interagirem com receptores celulares.

Apesar dos estudos recentes, os efeitos de interferentes endócrinos são observados desde o início do século XX por diversos autores. Em 1930, Walker e Janney publicaram um estudo sobre a mimetização de hormônios endógenos de animais por certos compostos químicos (Walker e Janney, 1930).

Em 1939, foi descrito que compostos alquilfenólicos podiam causar efeitos endócrinos adversos por se ligarem ao receptor hormonal (Jobling *et al.*, 1998). Um estudo realizado por Burlington e Linderman (1950) relatou que galos tratados com DDT apresentaram testículos menores e não possuíam cristas e barbelas como galos normais (Colborn *et al.*, 1998).

Em 1965 foi publicado o primeiro artigo científico sobre hormônios humanos em matrizes aquáticas por Tumm-Zollinger e Fair, mostrando que os esteróides não eram completamente removidos após o tratamento convencional de água e esgoto.

Estudos da década de 70 observaram que embriões e filhotes machos de gaivotas que viviam no Lago Ontário no Canadá, possuíam ovidutos e ovários; posteriormente pesquisas mostraram que essa feminização poderia ser decorrente de inseticidas como o diclorofenol e metoxicloro. Ainda em 1970, trabalhadores de uma fábrica de produtos químicos tiveram drástica diminuição do número de espermatozóides após exposição ao kepone (produto químico utilizado como inseticida e matéria-prima para processamento de outros produtos) (Guzelian, 1997).

No ano de 1971 foi publicado um artigo relatando que de cada 8 mulheres que faziam tratamento de carcinoma vaginal, 7 eram filhas de mulheres que haviam ingerido DES (dietilestilbestrol) nos três primeiros meses de gestação (Herbst *et al.*, 1997). McLachlan e colaboradores (1975) detalharam em um estudo os danos reprodutivos provocados em camundongos machos que haviam sido expostos ao DES antes do nascimento, e em estudos seguintes mostraram que camundongos fêmeas apresentaram adenocarcinoma vaginal quando expostos ao DES no período pré ou neonatal (Newbold and McLachlan, 1997).

Foi observada em meados de 1980 uma queda reprodutiva de jacarés que viviam no Lago Apokpa, Flórida; a quantidade de ovos que eclodiam era baixa, e pesquisas mostraram uma morfologia anormal no ovário, correlacionado ao aumento no nível de estradiol no sangue, observou-se também que muitos jacarés tinham pênis menor que o normal, e que os juvenis apresentavam baixa concentração de testosterona (Guillette *et al.*, 1994).

Em dezembro de 1996 foi organizado o primeiro evento Europeu em Weybridge, dedicado aos estudos do impacto dos interferentes endócrinos sobre a saúde humana e animal, e na reunião da câmara ambiental do G8 em 1997, foi formada uma coordenação internacional visando ações específicas para os interferentes endócrinos (COM, 1999).

Em 2002 o IPCS – International Programme on Chemical Safety publicou uma compilação de estudos contendo informações sobre a avaliação global em relação aos interferentes endócrinos.

No Brasil, foram relatados recentemente alguns efeitos de exposição à interferentes endócrinos em matrizes ambientais. Fernandez e colaboradores (2010) relataram a exposição de organismos marinhos à compostos orgânicos contendo estanho, o tributilestanho (TBT) e o trifenilestanho (TPT), no litoral do Rio de Janeiro e Fortaleza, e o conseqüente desenvolvimento de caracteres sexuais masculinos em fêmeas de moluscos, fenômeno conhecido como “imposex”.

Koifman e colaboradores (2002) apresentaram os resultados de um estudo epidemiológico, relacionando a exposição a pesticidas durante os anos 80 e os distúrbios reprodutivos, tais como, câncer de mama, ovário e próstata, taxas de avaliação de esperma, observados nos anos 90 em estados brasileiros.

Torres e colaboradores (2002) investigaram a concentração e destino de pesticidas, bifenilas policloradas (PCB) e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) na bacia hidrográfica Paraíba do Sul, importante bacia para o abastecimento da população de 2 estados brasileiros.

Existem muitos mecanismos pelos quais os interferentes endócrinos (IEs) podem interferir e causar distúrbios no sistema endócrino, o principal é a ligação do IE a um receptor hormonal celular, fato que, desencadeia efeitos que levam à modificações na expressão gênica, ou seja, interferindo na ação hormonal.. Um IE pode ter seu mecanismo de ação em um receptor hormonal e provocar diferentes respostas.

Dentre os hormônios, os que mais despertam interesse, seja pelo efeito ou pela quantidade que é descartada para o meio ambiente, são os hormônios sexuais femininos, principalmente os estrógenos naturais 17β -estradiol, estrona e estriol; e os sintéticos 17α -etinilestradiol, todos esses possuem efeito agonista no sistema endócrino.

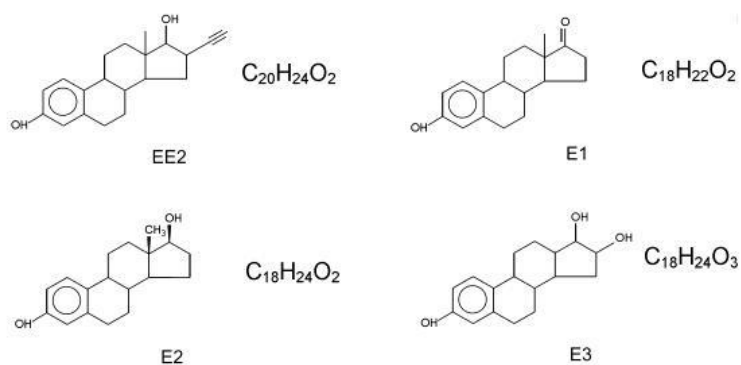


Figura 1 – Estrutura molecular de estrogênios

Os hormônios sexuais são parte do grupo dos esteróides, são compostos biologicamente ativos sintetizados a partir do colesterol e são divididos em 3 classes:

- C21: derivados do pregnano (progestógenos)

-C19: derivados da testosterona (andrógenos)

-C18: derivados da estrona (estrógenos)

Os estrógenos esteróides são caracterizados pelo anel A-fenólico, responsável pela formação do ácido 3-hidroxila, essencial para sua atividade biológica.

Compostos pouco solúveis e com alto coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}), tem maior probabilidade de serem encontrados em organismos, podendo se bioacumular ou biomagnificar ao longo da cadeia alimentar. De acordo com Ghiselli (2006), os mecanismos de sorção são as interações hidrofóbicas caracterizadas pelo valor de coeficiente de partição octanol/água (absorção) e a adsorção que está relacionada às interações eletrostáticas e a constante de dissociação (pK_a) no meio aquático.

Além dos hormônios sintéticos e naturais, outras substâncias são classificadas como interferentes endócrinos, dentre estas incluem-se: praguicidas, PCBs, ftalatos, organoclorados, HPAs, retardantes de chama bromados e alguns metais.

Além de serem associados aos efeitos no sistema endócrino, alguns poluentes são também persistentes, lipofílicos, bioacumulativos e têm baixa pressão de vapor, o que facilita a dispersão e difusão no meio ambiente (Bila e Dezotti, 2007).

Essa gama de substâncias químicas, denominadas xenoestrogênios são utilizadas para produção de diversos produtos nos mais variados setores; tem a capacidade de mimetizar ou bloquear a ação dos hormônios endógenos, podendo também alterar a forma como os hormônios e seus receptores protéicos atuam, como são produzidos e metabolizados (Ghiselli e Jardim, 2007).

O aporte dessas substâncias no meio ambiente se dá por diversas atividades, uma das principais é o descarte de efluentes em corpos hídricos, Campbell e colaboradores (2006) abordam a origem e destino dos estrogênios no meio ambiente (Figura 2).

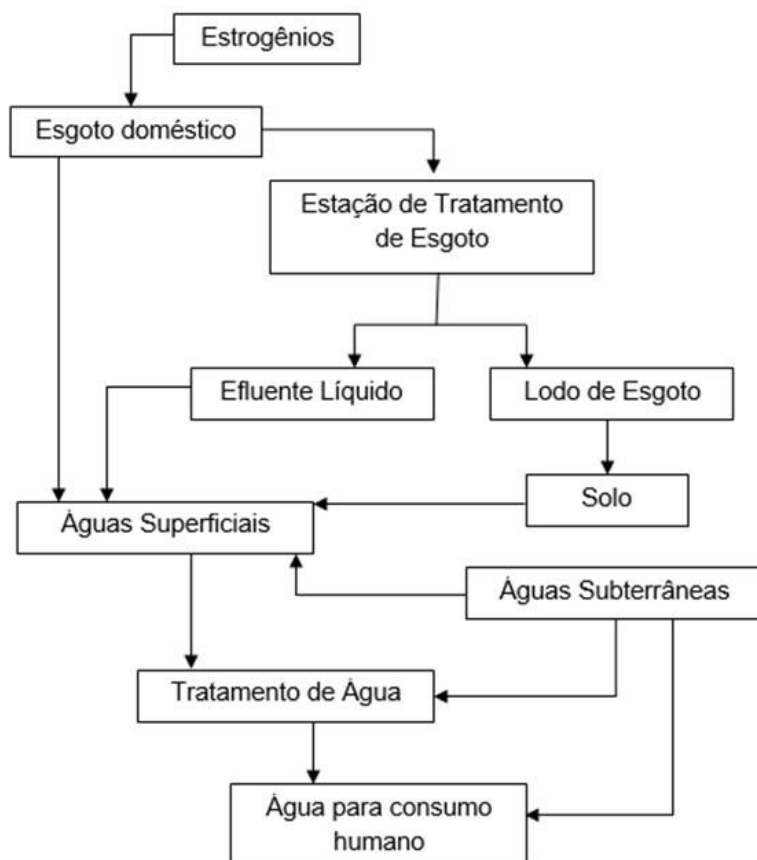


Figura 2 – Origem e destino dos interferentes endócrinos

(adaptado de Campbell *et al.*, 2006)

A principal via de introdução de interferentes endócrinos em águas superficiais no Brasil está relacionada ao descarte de efluente bruto, uma vez que 67% dos municípios brasileiros não possuem rede coletora de esgoto, e 33% destes tem acesso ao esgoto tratado (Raimundo, 2011).

Os processos convencionais de tratamento tanto de água, quanto de esgoto, não são eficiente para muitos contaminantes, devido principalmente às características físicas

e químicas dos mesmos, como por exemplo a polaridade de um composto (Stackelberg *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2011). A eliminação dos interferentes endócrinos das águas superficiais, depende da eficiência nos tratamentos nas ETAs, bem como, do conhecimento das características intrínsecas de cada composto (Snyder, 2008).

1.1. Principais contribuições

O presente projeto tem como ênfase a investigação da presença de atividade hormonal em águas superficiais do estado de São Paulo, e dos possíveis efeitos em organismos representativos da biota aquática, causados pela presença de substâncias com capacidade de alteração na função hormonal, como por exemplo: os praguicidas (Fipronil, Carbendazim, Imidacloprida, Simazina, Carbofurano, Hexizinona, Tebutiron, Ametrina, Atrazina, Diuron, Clomazona, Azoxistrobina, Malation, Tebuconazole e 2,4-D), hormônios (Estrona, Estradiol, Estriol, Etinilestradiol, Progesterona, Testosterona e Dietilestilbestrol), Triclosan, Bisfenol-A, Octilfenol e Nonilfenol; além da cafeína como traçador de atividade antrópica (indicativo da presença de esgoto doméstico).

A identificação de substâncias suspeitas de causar interferência endócrina tem sido reportada em escala mundial, porém os efeitos e destino destas ainda não é totalmente estabelecido. Ainda, a classificação destas substâncias quanto ao seu potencial de atividade hormonal é um desafio, pois os efeitos relatados na literatura até o presente momento são dados por concentrações muito baixas (ng L^{-1} - $\mu\text{g L}^{-1}$). Para tanto, torna-se imprescindível a importância da avaliação da qualidade dos corpos hídricos, uma vez que essa matriz é o principal corpo receptor de aporte de efluentes.

2. Objetivo

O presente estudo visa a identificação e quantificação da atividade hormonal e dos interferentes endócrinos em águas superficiais do estado de São Paulo.

2.1. Objetivos específicos

- Investigar os pontos da rede de monitoramento das águas superficiais do Estado de São Paulo que apresentam atividade hormonal, por meio dos bioensaios *in vitro* Bioluminesce Yeast Estrogen Screening (BLYES).
- Com os resultados da presença de atividade hormonal, será realizada a caracterização química dos principais hormônios femininos, praguicidas e compostos que possuem capacidade de mimetizar a ação hormonal, utilizando a técnica de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS).
- Exposição *in vivo* de ovos de *Danio rerio*, de acordo com a OECD nº236 aos extratos das amostras de água superficial testadas no BLYES, para de avaliar os efeitos causados no desenvolvimento dos organismos aquáticos.

3. Metodologia

3.1. Partes envolvidas

O presente estudo será realizado em parceria com a CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo), com o Laboratório de Química Analítica da Universidade de Campinas (UNICAMP), com o Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA) do Instituto Butantã, e com o Laboratório de Ecotoxicologia e Citotoxicidade do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).

O Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA) em atendimento às demandas da sociedade, usa suas competências para propor soluções inovadoras aos programas de políticas públicas, em projetos de pesquisas e serviços à clientes privados. Os objetivos do CQMA estão voltados para a formação e o aperfeiçoamento de recursos humanos, para o desenvolvimento científico e tecnológico e a prestação de serviços de alto cunho tecnológico, nas áreas de tecnologia química e nuclear, meio ambiente, química ambiental e química nuclear.

O Laboratório de Ecotoxicologia e Citotoxicidade, parte integrante do CQMA, ancorado em importantes parcerias, submete o projeto anexo ao presente edital, acreditando na sua importância para a sociedade.

3.2. Plano de amostragem

O plano de amostragem será estabelecido de acordo com a Rede de Monitoramento de Águas Superficiais do Estado de São Paulo. A quantificação da atividade hormonal presente nos pontos monitorados em 2013 e 2014, foi estudada para a escolha dos pontos a serem amostrados em 2015 e 2016.

Em 2013 e 2014 foram escolhidos 35 pontos da Rede de Monitoramento de Águas Superficiais do Estado de São Paulo para avaliação da atividade hormonal (Figura 3). Foi realizado o ensaio BLYES para cada amostra coletada, a fim de investigar os pontos com atividade hormonal presente. Após a análise desses resultados, foram escolhidos os pontos de monitoramento para o ano de 2015 e 2016.

O presente estudo avaliará a atividade hormonal em 10 pontos de monitoramento, e será realizado com a medição da atividade hormonal com aplicação do ensaio de BLYES e posterior caracterização química, para identificação e quantificação dos compostos com atividade hormonal, e com o bioensaio *in vivo* Fish Embryo Test (FET) para avaliação dos efeitos causados após exposição aos compostos que possuem capacidade de mimetização hormonal e estão presentes nas águas superficiais do estado de São Paulo.

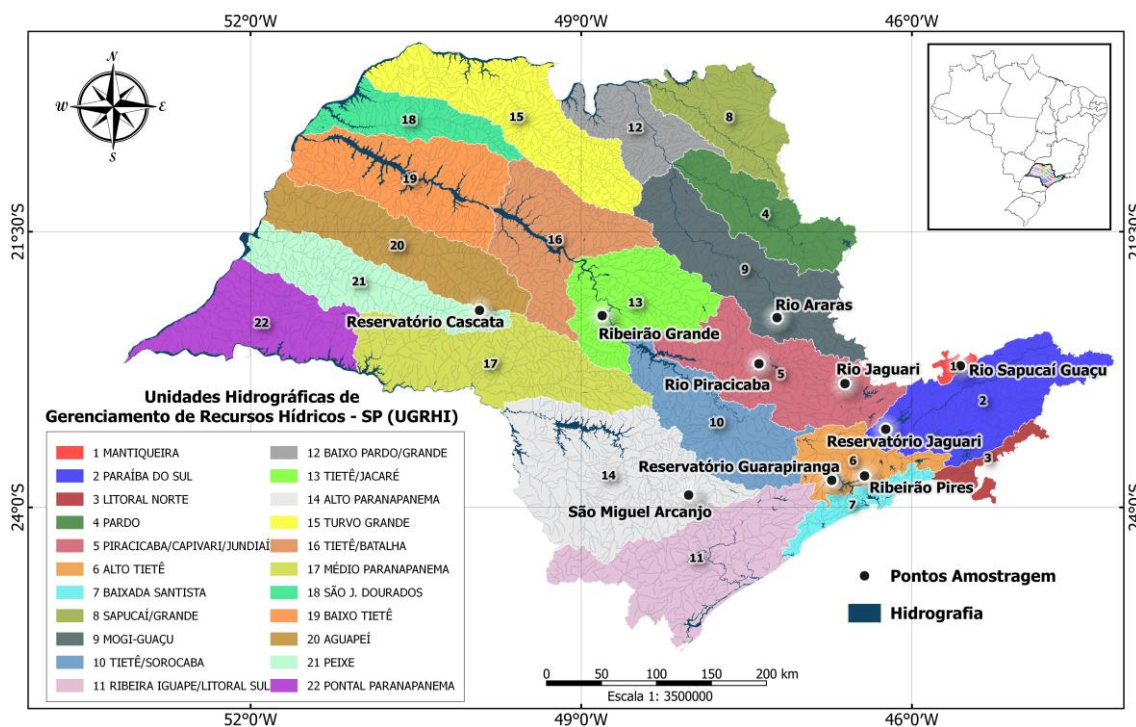


Figura 3 – Mapa da localização dos pontos de coleta em 2015-2016

3.3. Coletas e Preparo das amostras

As amostras foram coletadas pelo Setor de Coletas da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), em frasco âmbar de 1 litro, de acordo com o Guia Nacional de Coletas de Amostras (ANA, 2011). Após a coleta os frascos contendo as amostras são vedados com papel alumínio e levados para o laboratório. Durante todo o procedimento foram utilizadas luvas nitrílicas para o manuseio, para evitar qualquer contaminação das amostras.

No laboratório as amostras foram preservadas a 4°C, em refrigerador, sem adição de conservantes até a realização dos procedimentos de extração dos compostos de interesse, que não deve demorar mais que 24 horas após a coleta.

3.3.1. Extração em fase sólida (SPE)

O preparo das amostras foi realizado utilizando a técnica analítica de extração em fase sólida (SPE), método que consiste na retenção dos compostos de interesse, buscando reduzir os interferentes da matriz, e concentra-se os analitos para facilitar a determinação dos compostos encontrados em baixas concentrações.

De acordo com Souza (2011), a SPE é uma técnica sensível de separação líquido-sólido para extrair, concentrar e purificar os analitos não voláteis e semi-voláteis em amostras complexas pelo mecanismo de separação da cromatografia líquida de baixa pressão. A retenção dos analitos de interesse na fase sólida são: adsorção, partição (fase normal e reversa), troca iônica e exclusão, podendo envolver interações não polares, polares e iônicas (JARDIM, 2010).

A técnica de SPE pode ser empregada por cartuchos, discos, colunas, bandejas perfuradas e ponteiros recheadas com material sorvente (SANTOS NETO, 2007). A

escolha do material sorvente depende dos analitos de interesse, e são considerados: a estrutura química do analito, as propriedades do sorvente e a composição da matriz da amostra (JARDIM, 2010).

Para o preparo da amostra, o método é considerado bom, se atinge alguns parâmetros, dentre os quais: deve atingir recuperações próximas à 100%, remover os interferentes da amostra, em um único procedimento incluir compostos com propriedades distintas, proporcionar robustez, boa precisão, baixo custo, e, deve utilizar volume reduzido de solvente (Lanças, 2004).

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

Etapas da SPE:

1. Condicionamento do disco (onde ocorre a ativação no dispositivo de extração)
2. Aplicação da amostra
3. Remoção dos interferentes para lavagem do sorvente
4. Eluição dos analitos

A extração das amostras foi realizada a vácuo, utilizando discos Oasis HLB (hydrophilic-lipophilic-balance) de alta capacidade, o disco de extração, nos quais as partículas ativas são imobilizadas em uma matriz inerte e estável de microfibras de politetrafluoretileno (PTFE) ou vidro, com 47 mm de diâmetro interno e 0,5 mm de espessura, contendo 500 mg de sorvente.

Os discos são condicionados em 15mL de metanol e 10mL de água ultrapura, em um extrator automático Horizon SPE DEX 4790. O sorvente promove para o monômero lipofílico um mecanismo de fase reversa para retenção dos analitos por meio de interações hidrofóbicas, e o polímero hidrofílico tem propriedades umectantes, acarretando na retenção de compostos polares por interações fortes. Após a passagem da amostra, o disco HLB será seco por nitrogênio por 15 minutos. A eluição do disco será então realizada com 3 x 5 mL de metanol. O preparo das amostras foi realizado no Setor de Análises Toxicológicas (ELTA) na Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB).

3.3.2. Concentração das amostras

Após a eluição, os analitos (± 15 mL) são acondicionados em vials de 40 mL, e posteriormente concentrados no evaporador Genevac, durante ± 1 hora a 35°C (ou até que a amostra tenha 1 mL), e será transferida com auxílio do solvente metanol para vials de 1,8 mL, concentrando-se a amostra novamente, até a total evaporação do metanol. Após esse procedimento o extrato foi acondicionado por até 90 dias, abaixo de 0°C.

3.4. *Bioluminescent Yeast Estrogen Screen (BLYES)*

Bioensaio *in vitro* para a avaliação da atividade hormonal utilizando a linhagem BLYES em extratos de água bruta. Para realização do ensaio utiliza-se a linhagem de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), capaz de responder a agentes estrogênicos presentes nas amostras ambientais.

Para aplicação neste ensaio as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foram modificadas pela inserção de um gene para expressão do receptor de estrogênio humano (hER), que se liga aos elementos de resposta ao estrogênio, inseridos em um promotor de um plasmídeo que controla a expressão de genes de bactérias luminescentes, sendo assim a levedura é capaz de emitir luz quando entra em contato com alguma substância que se liga ao hER, ativando o promotor.

É realizado em paralelo um controle de toxicidade, por uma linhagem que emite luz continuamente (BLYR). Os resultados são expressos quantitativamente por meio da atividade hormonal equivalente (E2 eq.).

3.5. Caracterização química

A técnica analítica utilizada na identificação e quantificação dos compostos foi LC/MS (Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas).

3.5.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia é uma das técnicas mais utilizadas, devido à facilidade da separação, identificação e quantificação espécies químicas. O processo de cromatografia líquida força por pressões elevadas, a passagem do solvente, por meio de colunas fechadas, que contém partículas muito finas, proporcionando assim separações bastante eficientes (alta resolução). O dispositivo consiste em: um amostrador automático, um sistema de distribuição de solvente, uma válvula de injeção de amostra, uma coluna de alta pressão, e quando acoplado ao espectrômetro de massa, o mesmo atua como detector (Harris, 2010).

3.5.2. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica utilizada para identificar substâncias químicas, fornecendo informações qualitativas e quantitativas da composição de materiais orgânicos e inorgânicos (Vega-Bustillos, 2001).

A análise por MS consiste na geração de íons com base em compostos (orgânicos ou inorgânicos) por meio de um método de ionização apropriado. Após isso, os íons são separados por relação massa-carga (m/z) em um analisador de massas e detectados quali/quantitativamente por meio de um detector. A magnitude do sinal elétrico em função da razão m/z é convertida por um processador de dados, que gera o espectro de massas correspondente.

A análise química identifica o composto e a concentração na amostra ambiental de acordo com o método empregado. Porém, os efeitos causados pela exposição a compostos que possuem atividade hormonal, somente podem ser confirmados após exposição dos organismos.

3.6. Bioensaio *in vivo* com *Danio rerio*

O presente trabalho tem como objetivo determinar os efeitos causados por compostos considerados interferentes endócrinos em *Danio rerio*. Para tal objetivo será necessário realizar a reprodução destes organismos, assim serão realizados ensaios de toxicidade agudos de acordo com a OECD nº236. Os embriões de *Danio rerio* serão obtidos do LETA – Instituto Burantã e serão expostos aos extratos das amostras previamente testados no BLYES, e observados por um período de 96 horas, conforme citado no protocolo da OECD. Os efeitos agudos observados serão: ausência de batimento cardíaco, não desprendimento da cauda, não formação de somitos, e coagulação. Além dos efeitos agudos, serão avaliados os efeitos subletais: microcefalia, tamanho reduzido, curvatura da coluna vertebral, e formação de edema cardíaco e vitelínico.

Visando a menor utilização de organismos de alta complexidade em testes laboratoriais, a OECD nº236, especifica o método para avaliação da toxicidade durante 96 horas de exposição, utilizando embriões das espécies de peixes *Danio rerio* para amostras de efluentes, águas continentais e substâncias químicas. O Fish Embryo Test (FET) é considerada uma alternativa à utilização de organismos adultos (BRAUNBECK, 2005), e fornece uma boa resposta quanto à exposição a agentes químicos presentes em matrizes ambientais

A utilização da espécie de peixe *Danio rerio* em bioensaios *in vivo* têm sido amplamente utilizada em âmbito internacional, pois esta espécie foi indicada como um excelente modelo animal experimental, devido à sua capacidade de adaptação a diversas condições ambientais é considerado um bom bioindicador, podendo assim promover a integração de resultados e pesquisas realizadas em todo o mundo.

Sendo assim, espera-se que com a realização de bioensaios *in vivo* utilizando os embriões de *Danio rerio*, seja possível avaliar os efeitos que os compostos considerados interferentes endócrinos causam na biota aquática, e assim, sugerir um valor de referência para que o descarte e utilização de tais substâncias sejam revisados pelas agências regulamentadoras.

4. Cronograma

Projeto de Pesquisa	2017	2018	2019
Realização do BLYES	•	•	•
Realização das Análises Químicas	•	•	•
Realização do FET	•	•	•
Relatório final e prestação de contas			•

5. Orçamento detalhado

a. Materiais Permanentes e Equipamentos

- 1 Freezer vertical
- 1 Geladeira
- 1 Notebook
- 1 Computador Desktop

R\$ 10.000,00

b. Materiais de Consumo

- Drogas e Reagentes: solventes, padrões, etc
- Materiais plásticos para realização dos ensaios: placas de cultuas de células, tubos falcon, pipetas, etc

R\$ 60.000,00

c. Serviços Externos

- Serviços de adaptação de estrutura laboratorial

R\$ 60.000,00

6. Equipe técnica do IPEN

Coordenador do projeto:

Prof. Dr. José Roberto Rogero

Pesquisadores:

MSc. Sizue Ota Rogero

Dra. Nilce Ortiz

Alunos de doutorado:

MSc. Gisela de Assis Martini

MSc. Dymes Rafael Alves dos Santos

Alunos de mestrado:

Adriana Kuchinski Cavalcante

Joana Maziero da Silva

Kelme Cardoso Damaceno

Bolsista de projeto:

Fernanda Caroline da Silva Mamede

Bolsista de iniciação científica:

Matheus Beani Ormenio

Heloísa Rosa

7. Parceiros e Colaboradores Externos

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB:
Dr. Gilson Alves Quinágua

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP:
Dra. Cassiana Montagner Raimundo

Instituto Butantã:
Dra. Mônica Lopes-Ferreira

8. Referências Bibliográficas

Bila, D. M., Dezotti, M., Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências, *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 3, 651-666, 2007

Birchenough, A. C., Barnes, N., Evans, S.M., Hinz, H., Krönke, I., Moss, C. A review and assessment of tributyltin contamination in the North Sea, based on surveys of butyltin tissue burdens and imposex/intersex in four species of neogastropods, *Mar. Pollut. Bull.* 44, 534–543. 2002.

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

Braunbeck, T.; Bottcher, M.; Hollert H.; Kosmehl T.; Lammer, E.; Leist, E.; Rudolf, M.; Seitz, N.; Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species – an Update. *Altex*, v.22, n.2, p.87-102, 2005.

Campbell, G. C., Borglin, S. E., Green, F. B., Grayson, A., Wozei, E., Stringfellow, W. T. Biologically directed environmental monitoring, fate and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: a review, *Chemosphere*, 65. 2006

Céspedes, R., Petrovic, M., Raldúa, D., Saura, U., Piña, B., Lacorte, S., Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC–ESI–MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 697–708. 2004.

Colborn, T., Vom Saal, F.S., Soto, M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans, *Environ. Health Perspect.* 101, 378–384. 1993

COM – Comissão da Comunidades Europeias, *Estratégia comunitária em matéria de desreguladores endócrinos – substâncias suspeitas de interferir com os sistemas hormonais dos seres humanos e dos animais.* 1999.

Fernandez, M. A.; Limaverde, A. M.; Castro, I. B.; Almeida, A. C. M.; Wagener, A. L. R.; *Cad. Saúde Pública*, 18, 463. 2002

Ghiselli, G, Jardim W., INTERFERENTES ENDÓCRINOS NO AMBIENTE, *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 3, 695-706, 2007.

Guillette, L., Gross, T., Masson, G. R., Matter, J. M., Percival, H. F., Woodward, A. R., Development abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in

juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environmental Health Perspective*, 102, 680-688, 1994.

Guillette, L.J.; Gundersen, M.P. Review alterations in development of reproductive and endocrine systems of wildlife populations exposed to endocrine-disrupting contaminants, *Reproduction* 122, 857–864. 2001

Guzelian, P. Fourteen workersexposed to pesticide kepon are probably sterile, researchs report. *Our stolen future, Occupational health and letters*, nº 2. 1997

Herbst, A., Ulfelder, H., Poskanzer, Adenocarcinoma of the vagina: association of maternal estilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *New England of Medicine. Our stolen future, RSL and PM*, 284, 878-881. 1997

Ikehata, K., El-Din, M. G., Snyder, S. A, Ozonation and advanced oxidation treatment of emerging organic pollutants in water and wastewater, *Ozone: Sci. Eng.* 30, 2008.

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

Jardim, I. C. S. F. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para a preparação de fases sólidas. *Sci. Chromatogr.*, v.2, n.1, 13-25. 2010.

Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C. R., Brighty, G., Sumpter, J. P., Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science Technology*, 2498-2506. 1998.

Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., Sumpter, J.P. Widespread sexual disruption in wild fish, *Environ. Sci. Technol.* 32, 2498–2506. 1998.

Koifman, S.; Koifman, R. J.; Meyer, A.; *Cad. Saúde Pública*, 18, 435. 2002

McLachlan, J., Newbold, R., Bullock, B., Reproductive tract lesion in male nice exposed prenatally to diethylstilbestrol. *Science*, vol.190, 1975.

Pal, A., Gin, K.Y.-H., Lin, A.Y.-C., Reinhard, M. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects, *Sci. Total Environ.* 408, 6062–6069. 2010.

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

Routledge, E. J., Sumpter, J. P. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast assay; *Environ. Toxicol. Chem.* 1996.

Sanseverino, J., Gupta, R. K., Layton, A. C., Patterson, S. S., Ripp, S. A., Saidak, L., Simpson, M. L., Schults, T. W., Saylor, G. S. Use of *Saccharomyces cerevisiae* BLYES expressing bacterial bioluminescence for rapid, sensitive detection of estrogenic compounds, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71. 2005.

Souza, R. R. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de disruptores endócrinos resultantes de atividades antrópicas nas águas da região do Rio Paraíba do Sul, SP. Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo. 2011.

Stackelberg, P. E., Gibs, G., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Zaugg, S. D., Lippincott, R. L. Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal of pharmaceuticals and other organic compounds, *Sci. Total Environ.*, 377. 2007.

Sumpter, J.P. Endocrine disrupters in the aquatic environment: an overview, *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 33, 9–16. 2005.

Theo Colburn, Dianne Dumanoski, & John Peterson Myers, *Our Stolen Future*. 1998

Torres, J. P. M.; Malm, O.; Vieira, E. D. R.; Japenga, J.; Koopmans, G. F.; *Cad. Saúde Pública*, 18, 477. 2002.

USEPA - United States Environmental Protection Agency, disponível em: <http://www2.epa.gov/region8/epa-biosolids-program-update-ppcps>, acesso em 31 de Outubro de 2014

USEPA – United States Environmental Protection Agency, *Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An effects assessment and analysis*. Repot N° EPA/630/R-96/01229. 1997

Walker, B. S., Janney, J. C., *Endocrinology* apud *International Water Association: workshop on endocrine disruptors*, vol. 14 (1930), 389-392

Wang, C., Shi, H., Adams, C. D., Gamagedara, S., Stayton, I., Timmons, T., Ma Y. Investigation of pharmaceuticals in Missouri natural and drinking water using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; *Water Res*, 45. 2011.

Willem, J., Lamoree, M. H., Houtman, C. J., Hamers, T., Somsen, G. W., Koll, J. Rapid activity-directed screening of estrogens by parallel coupling of liquid chromatography with a functional gene reporter assay and mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1406, 165–174 . 2015.

