



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Faculdade de Engenharia

Louise da Cruz Felix Valadares

**DINÂMICA E EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DE
DESREGULADORES ENDÓCRINOS EM AMBIENTES ESTUARINOS**

Rio de Janeiro

2024

Louise da Cruz Felix Valadares

**DINÂMICA E EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DE DESREGULADORES
ENDÓCRINOS EM AMBIENTES ESTUARINOS**



Tese apresentada como requisito para obtenção de título de doutor, ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Área de concentração: Saneamento Ambiental – Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Daniele Maia Bila

Rio de Janeiro

2024

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

V136 Valadares, Louise da Cruz Felix.
Dinâmica e efeitos ecotoxicológicos de desreguladores endócrinos em
ambientes estuarinos / Louise da Cruz Felix Valadares. – 2024.
147 f.

Orientadora: Daniele Maia Bila.
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Faculdade de Engenharia.

1. Engenharia ambiental - Teses. 2. Água - Poluição - Teses. 3.
Sedimentos marinhos - Teses. 4. Toxicologia ambiental - Teses. 5. Estrógenos
- Teses, I. Bila, Daniele Maia. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Faculdade de Engenharia. III. Título.

CDU 62:502.3

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

**Dinâmica e efeitos ecotoxicológicos de desreguladores endócrinos em ambientes
estuarinos**

Tese apresentada como requisito para obtenção de título de doutor, 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.

Aprovado em:

Banca examinadora:

Dr^a. Daniele Maia Bila (Orientadora)

Faculdade de Engenharia – UERJ

Dr. André Luís de Sá Salomão

Faculdade de Engenharia – UERJ

Dr^a. Ana Dalva de Oliveira Santos

Geociências – UFF

Dr^a. Sônia Lopes Rezende de Melo

Petrobras Transporte S.A. - Transpetro

Dr^a. Juacyara Carbonelli Campos

Escola de Química - UFRJ

Dr. José Antônio Baptista Neto

Geociências - UFF

Rio de Janeiro

2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Cristo meu Senhor e Salvador que me sustentou em força, determinação e sabedoria para encarar essa jornada de doutoramento. Minhas orações foram diárias para a conclusão desta etapa da minha vida. Somente pela sua infinita bondade e misericórdia, estou aqui hoje apresentando este trabalho, junto de meus amados familiares e amigos.

Agradeço ao meu paciente e amoroso marido, que aturou, respeitou e acalentou meus muitos surtos aos longos dessa quádrupla jornada que adotei em parte destes longos 4 anos e 8 meses de doutoramento. Obrigada pela sua parceria de vida nesses quase 15 anos de relacionamento. Por ser meu motorista particular nas tardes noites de experimento no laboratório. Nada disso seria possível sem você na minha vida. Somos uma ótima equipe!!!

Agradeço aos meus irmãos que sempre forma meus protetores, conselheiros e melhores amigos. Obrigada por serem meus exemplos de ética, esforço, determinação e trabalho. Compartilho toda minha gratidão por serem sempre compassivos, me suportarem nos surtos de raiva na juventude e terem me dado os melhores sobrinhos que poderia ter.

Não existe a possibilidade de não agradecer aos meus pais...eu sinceramente não tenho palavras. Meu coração se enche de alegria e gratidão por ter vocês aqui comigo e terem me apoiado desde a época que eu era uma jovem tola e idealista que queria mudar o mundo, ser presidente, médica, astronauta e mil outras coisas. Obrigada por me guiarem nessa vida louca. O exemplo e criação de vocês me fizeram decidir ser pesquisadora e professora. Me fizeram e fazem acreditar que a educação transforma.

Agradeço a toda minha GRANDE e bagunçada família. Em especial ao meu avô Renê, *in memoriam*, que sempre perguntava mil informações sobre as minhas pesquisas e brincava comigo sobre qual mais invenção de moda eu faria em termos de estudos. Tenho certeza de que este momento seria uma imensa alegria pra ele. Agradeço a todas as minhas tias que são minhas segundas, terceiras, quartas...mães. Obrigada por segurarem a barra, pelas orações, pelas risadas e tanto mais. A minha prima-irmã Nathália que foi até fazer faxina na minha casa enquanto eu dividia meu tempo com trabalho e doutorado. Obrigada a todos meus primos e primas, tios, cunhados e cunhadas, sobrinhos, sogra, e todos os agregados de família que carrego com tanto amor no peito.

Agradeço as minhas irmãs de criação, que toleraram minhas ausências e meu cansaço nos poucos eventos que estava. Obrigada por me incentivarem na minha maluquice. Obrigada por me darem sobrinhos lindos, perfeitos e mais amados do mundo.

Não existe orientadora melhor do que a minha! Eu agradeço a ela todos os dias pessoalmente pela pareceria incrível. Agradeço a ela por acreditar no meu potencial desde 2011 em uma aula de introdução a Eng. Ambiental. Agradeço pelas oportunidades de desenvolver ciência juntas, por me ensinar tanto sobre o que é o ensino universitário, a orientação e sobretudo a vida. Agradeço por ter chorado comigo muitas vezes e ter enxugado as minhas lágrimas, dizendo que estaria comigo em todos os momentos. Obrigada por não ter largado a minha mão. Obrigada por ter me forçado até o final! Obrigada pela paciência e pelo esforço! Sem você não teria finalizado o doutorado, na verdade, não teria nem iniciado a vida acadêmica.

São tantos os agradecimentos que preciso fazer, que terei que escrever um livro!

Agradeço a banca por ter aceitado o convite e por contribuir com novos olhares e perspectivas para a melhoria da pesquisa. Obrigada pelo tempo de leitura e por todos os comentários para me auxiliar na elucidação da pesquisa.

Todos dizem que o doutorado é uma jornada longa e solitária. Eu agradeço por não ter sido assim para mim. A todos os meus companheiros e amigos de laboratório só tenho a agradecer por terem contribuído com cada fragmento do estudo. Desde conversas sobre metas de elaboração da pesquisa até tardes noites comigo no laboratório lendo só para não me deixar sozinha. Allan, Giselle, Tainá, Thaynara, Layla, Sidnei, Aninha, Daniela, Bia baby, Stella, Arthur, Fabiana, Carolina, Thaís e toda turma do LES. Agradeço a dona Celiana, que se prontificou a ser a motorista da coleta em Ubatuba! O LES é lindo!

Obrigada aos meus parceiros e amigos de outros laboratórios que me ajudaram em diversas análises. Ao pessoal da UFF, Alex, Marília e Ana que sempre são meu grupo amado de pesquisa em ecotox. Obriga a turma do CENPES por me apoiarem a confiarem nas minhas ideias. Agradeço a Miriam, Rodrigo, Leandro, Alberto, Gleidice, Taísa, Elton, Karol, Nícolas, Marlon, Lili, Anna, João e Max. Obrigada por cada risada, por cada trabalho juntos, por cada ação de compreensão com meu doutorado e por todo carinho no trabalho.

Encerro com meu muito obrigada aos meus amigos de vida, que são muitos, e que sempre me apoiam e acreditam que eu terei sucesso nas minhas empreitadas. Obrigada por terem mantido a amizade mesmo a distância. Como diz Marina, minhas ausências são tantas que pareço uma amiga imaginária. Obrigada Ariene, Macau, Vinícius, Nono, Allana, Juliana, Ana Carol, Marina, Thamires, Kassia, Thaís e todos que participam da minha vida.

Agradeço ao CNPq, FAPERJ e UERJ pelo fomento financeiro, pela infraestrutura e por acreditarem na ciência!

RESUMO

VALADARES, Louise da Cruz Felix. *Dinâmica e efeitos ecotoxicológicos de desreguladores endócrinos em ambientes estuarinos*. 2024. 147 f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Os desreguladores endócrinos são compostos capazes de provocar efeitos adversos ao sistema endócrino dos organismos expostos, mesmo quando presentes em baixíssimas concentrações. Estes poluentes apresentam diferentes mecanismos de transporte e acúmulo, estando amplamente distribuídos em diferentes compartimentos ambientais, com destaque para os sedimentos estuarinos. Estes sedimentos, frequentemente impactados pela poluição proveniente do lançamento de esgoto doméstico, desempenham um papel relevante na dinâmica de contaminação ambiental. No entanto, a presença de desreguladores endócrinos em sedimentos e os impactos dessa contaminação na dinâmica ambiental e nas cadeias tróficas de ambientes estuarinos ainda são pouco estudados. Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar a biodisponibilidade, os processos de adsorção/dessorção e os efeitos adversos desses contaminantes nos sedimentos estuarinos. O estudo contempla a geração de dados de ensaios ecotoxicológicos, análises cromatográficas e de potencial estrogênico, além de caracterização físico-química de água, material particulado e sedimentos estuarinos oriundos de três localidades no Sudeste do Brasil. Foram avaliados cenários de potencial efeito ecotoxicológico em organismos expostos direta e indiretamente a esses contaminantes em ambientes estuarinos. Os resultados indicaram que a presença de matéria orgânica e a influência de águas salinas são fatores determinantes para a biodisponibilidade dos desreguladores endócrinos e para quantificação dos seus efeitos por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Nos estuários analisados, foram identificados cinco pontos de água e sedimento com potencial estrogênico, sendo que, em três desses pontos, o material particulado suspenso também apresentou potencial estrogênico. O ensaio *in vitro* YES mostrou-se eficiente no monitoramento de diferentes matrizes ambientais quanto à presença de substâncias com atividade estrogênica. Em contrapartida, os ensaios ecotoxicológicos tradicionais, baseados na análise de elutriatos e líquido intersticial, mostraram-se insuficientes para compreender plenamente os efeitos dos contaminantes nos organismos aquáticos. Sendo assim, torna-se necessário otimizar metodologias analíticas que retratam com maior precisão a dinâmica ambiental da contaminação e seus efeitos em organismos aquáticos expostos indiretamente as áreas contaminadas. Essa abordagem permitirá uma avaliação mais robusta do risco ecológico, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias de regulações e mitigações.

Palavras-chave: Desreguladores endócrinos; Biodisponibilidade; Sedimento estuarino; Ecotoxicologia aquática; Atividade estrogênica

ABSTRACT

VALADARES, Louise da Cruz Felix. *Dynamics and ecotoxicological effects of endocrine disruptors in estuarine environments*. 2024. 147 f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Endocrine disruptors (EDs) are compounds capable of causing adverse effects on exposed organisms, even at trace concentrations. These pollutants exhibit various transport and accumulation mechanisms, being widely distributed across different environmental compartments, with estuarine sediments standing out as a critical reservoir. These sediments, often impacted by pollution from domestic sewage discharges, play a significant role in the dynamics of environmental contamination. However, the presence of EDs in sediments and the impacts of this contamination on environmental dynamics and the trophic chain in estuarine environments remain underexplored. This study aims to evaluate the bioavailability, adsorption/desorption processes, and effects of these contaminants in estuarine sediments. The research encompasses the generation of data from ecotoxicological assays, chromatographic analyses, estrogenic potential evaluations, and the physicochemical characterization of estuarine sediments collected from three sites in Brazil. Scenarios of potential ecotoxicological effects on organisms directly and indirectly exposed to these contaminants in estuarine environments were assessed. The results indicated that organic matter content and the influence of saline waters are key factors affecting the bioavailability of EDs and the quantification of their effects through *in vitro* and *in vivo* assays. Among the estuaries analyzed, five water and sediment sampling points demonstrated estrogenic potential, with three of these points also exhibiting estrogenic activity in suspended particulate matter. The *in vitro* Yeast Estrogen Screen (YES) assay proved effective for monitoring different environmental matrices regarding the presence of estrogenic compounds. In contrast, traditional ecotoxicological assays based on the analysis of elutriates and interstitial water were insufficient to fully understand the effects of these contaminants on aquatic organisms. Thus, it is necessary to optimize analytical methodologies that more accurately reflect the environmental dynamics of contamination and their effects on aquatic organisms indirectly exposed to contaminated areas. This approach will enable a more robust assessment of ecological risks, contributing to the development of effective regulatory and mitigation strategies.

Keywords: Endocrine disruptors; Bioavailability; Estuarine sediment; Aquatic ecotoxicology; Estrogenic activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: ESQUEMA DOS PROCESSOS DE TRANSPORTE E ACUMULAÇÃO DE POLUENTES EM AMBIENTES AQUÁTICOS.....	24
FIGURA 2: ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS NORMATIVAS BRASILEIRAS USADAS PARA AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA, CRÔNICA E AGUDA, PARA COMPARTIMENTOS AMBIENTAIS ISOLADOS E INTERFACE.....	28
FIGURA 3: ESQUEMA DOS PROCESSOS DE ADSORÇÃO E ABSORÇÃO EM GRÃOS DE MATERIAL SÓLIDO, EXEMPLIFICANDO OS SEDIMENTOS EM CONTATO COM MATRIZ AQUOSA.....	35
FIGURA 4: ESQUEMA REPRESENTATIVO DO CENÁRIO 1: CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SEDIMENTO <i>IN NATURA</i> E ÁGUA SUPERFICIAL COLETADAS NAS ÁREAS DE ESTUDO E AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS DE PREPARO E EXTRAÇÃO.....	39
FIGURA 5: ESQUEMA REPRESENTATIVO DO CENÁRIO 2: USO DE SEDIMENTO ESTUARINO DE PARATY PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DA BIODISPONIBILIDADE DE CONTAMINANTES SOBRE A TOXICIDADE EM ORGANISMOS-TESTE PADRONIZADOS. CONTAMINANTES	40
FIGURA 6: ESQUEMA DE LOCALIZAÇÃO DAS ÁREAS GEOGRÁFICAS DELIMITADAS PARA O ESTUDO.....	41
FIGURA 7: ORGANOGRAMA COM AS SUBAMOSTRAS GERADAS A PARTIR DE CADA MATRIZ COLETADA EM RIO DAS OSTRAS E AS RESPECTIVAS ANÁLISES REALIZADAS EM CADA SUBAMOSTRA.....	46
FIGURA 8: ORGANOGRAMA COM AS SUBAMOSTRAS GERADAS A PARTIR DE CADA MATRIZ COLETADA EM UBATUBA E AS RESPECTIVAS ANÁLISES REALIZADAS EM CADA SUBAMOSTRA.....	47
FIGURA 9: ORGANOGRAMA COM AS SUBAMOSTRAS GERADAS A PARTIR DE CADA MATRIZ COLETADA EM PARATY E AS RESPECTIVAS ANÁLISES REALIZADAS EM CADA SUBAMOSTRA.	48
FIGURA 10: COMPARAÇÃO DAS METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO APLICADAS AOS SEDIMENTOS DE CADA PONTO DE COLETA E OS ENSAIOS REALIZADOS COM OS RESPECTIVOS EXTRATOS.	51
FIGURA 11: ETAPAS DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO, PARTIÇÃO E REMOÇÃO DE INTERFERENTES DA METODOLOGIA DE QUÉCHERS	52
FIGURA 12: ETAPAS DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM	53
FIGURA 13: ETAPAS DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO ACELERADA POR SOLVENTE COM PRESSÃO	54
FIGURA 14: ESQUEMA REPRESENTATIVO DA DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS POR FILEIRAS EM PLACAS DE 96 POÇOS PARA REALIZAÇÃO DO ENSAIO YES.....	59

FIGURA 15: GRÁFICOS DA SÉRIE HISTÓRICA (1991-2022) DE PRECIPITAÇÃO MENSAL DAS ÁREAS DE ESTUDO (A) UBATUBA; (B) PARATY; (C) RIO DAS OSTRAS, GERADOS PELOS MODELOS ECMWF DATA CENTER (EUROPEAN CENTRE FOR MEDIUM-RANGE WEATHER FORECASTS) E DISPONIBILIZADOS PELO CLIMATE DATA.	66
FIGURA 16: RESULTADOS DE % DE INIBIÇÃO DA BIOLUMINESCÊNCIA OBTIDOS NOS ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE DO ELUTRIATO DE SEDIMENTOS DE RIO DAS OSTRAS COM O ORGANISMO-TESTE <i>VIBRIO FISCHERI</i>	74
FIGURA 17: RESULTADOS DE % DE INIBIÇÃO DA BIOLUMINESCÊNCIA OBTIDOS NOS ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE DO ELUTRIATO DOS SEDIMENTOS DE UBATUBA E PARATY COM O ORGANISMO-TESTE <i>VIBRIO FISCHERI</i>	76
FIGURA 18: ESQUEMA QUE MOSTRA A REDUÇÃO NA INTENSIDADE LUMINOSA, QUE OCORRE DEVIDO À INTERAÇÃO DAS BACTÉRIAS LUMINESCENTES COM OS POLUENTES, O QUE INIBE A PRODUÇÃO DE LUCIFERASE AO SUPRIMIR OS PROCESSOS DE TRANSCRIÇÃO E TRADUÇÃO. ISSO RESULTA NA INIBIÇÃO DA REAÇÃO DE LUMINESCÊNCIA MEDIADA PELA LUCIFERASE BACTERIANA, LEVANDO A UMA DIMINUIÇÃO NA INTENSIDADE LUMINOSA.	77
FIGURA 19: RESULTADOS DE % DE INIBIÇÃO DA BIOLUMINESCÊNCIA OBTIDOS NOS ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE DO LÍQUIDO INTERSTICIAL DOS SEDIMENTOS DE UBATUBA E PARATY COM O ORGANISMO-TESTE <i>VIBRIO FISCHERI</i>	78
FIGURA 20: ILUSTRAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA REALIZADOS NO ESTUÁRIO DO RIO DAS OSTRAS.	82
FIGURA 21: CURVAS DOSE-RESPOSTA DAS AMOSTRAS DE SEDIMENTO ÚMIDO E LIOFILIZADO COM A UEA OBTIDAS NO ENSAIO <i>IN VITRO</i> YES.....	84
FIGURA 22: CURVA DOSE-RESPOSTA DA AMOSTRA DE SEDIMENTO DO PONTO 10 EXTRAÍDA SEGUNDO A METODOLOGIA QUÉCHERS PARA O ENSAIO YES.	85
FIGURA 23: CURVAS DOSE-RESPOSTAS DAS AMOSTRAS DE MATERIAL PARTICULADO, ÁGUA SUPERFICIAL FILTRADA E SEDIMENTO E POSTERIOR MEDIÇÃO DE ATIVIDADE ANTIESTROGÊNICA PARA O PONTO DE COLETA 4, RIO ACARAÚ, UBATUBA OBTIDAS NO DO ENSAIO <i>IN VITRO</i> YES.....	96
FIGURA 24: CURVAS DOSE-RESPOSTAS DAS AMOSTRAS DE MATERIAL PARTICULADO, ÁGUA SUPERFICIAL FILTRADA E SEDIMENTO E POSTERIOR MEDIÇÃO DE ATIVIDADE ANTIESTROGÊNICA PARA O PONTO DE COLETA 5, PRAIA DE JABAQUARA, PARATY OBTIDAS DO ENSAIO <i>IN VITRO</i> YES.	98
FIGURA 25: CURVAS DOSE-RESPOSTAS DAS AMOSTRAS DE MATERIAL PARTICULADO, ÁGUA SUPERFICIAL FILTRADA E SEDIMENTO E POSTERIOR MEDIÇÃO DE ATIVIDADE	

ANTIESTROGÊNICA PARA O PONTO DE COLETA 1, RIO INDAIÁ, UBATUBA OBTIDAS NO ENSAIO <i>IN VITRO</i> YES.....	99
FIGURA 26: CURVAS DOSE-RESPOSTAS DAS AMOSTRAS DE MATERIAL PARTICULADO, ÁGUA SUPERFICIAL FILTRADA E SEDIMENTO E POSTERIOR MEDIÇÃO DE ATIVIDADE ANTIESTROGÊNICA PARA O PONTO DE COLETA 2, RIO GRANDE, UBATUBA OBTIDAS NO ENSAIO <i>IN VITRO</i> YES.....	101
FIGURA 27: CURVAS DOSE-RESPOSTAS DO ENSAIO <i>IN VITRO</i> YES PARA AS AMOSTRAS DE MATERIAL PARTICULADO, ÁGUA SUPERFICIAL FILTRADA E SEDIMENTO E POSTERIOR MEDIÇÃO DE ATIVIDADE ANTIESTROGÊNICA PARA O PONTO DE COLETA 3, RIO TAVARES, UBATUBA.	103
FIGURA 28: CURVA DOSE-RESPOSTA DOS SOBRENADANTES DO ENSAIO DE BIODISPONIBILIDADE.	111
FIGURA 29: CURVA DOSE-RESPOSTA DOS SEDIMENTOS DO ENSAIO DE BIODISPONIBILIDADE. ...	112
FIGURA 30: GRÁFICO COM OS RESULTADOS DE ATIVIDADE ESTROGÊNICA (EQ-E2) CALCULADOS A PARTIR DO ENSAIO YES PARA TODOS OS PONTOS DE COLETA NAS ÁREAS DE ESTUDO. .	112

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: DESCRIÇÃO DOS PONTOS DE COLETA COM OS COMPARTIMENTOS AMBIENTAIS AVALIADOS, COORDENADAS GEOGRÁFICAS, MUNICÍPIO DE ORIGEM E DATA DE COLETA.....	45
TABELA 2: RESULTADOS DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS OBTIDOS PARA AS SUBAMOSTRAS DE ELUTRIATO DOS SEDIMENTOS COLETADOS EM CADA PONTO DAS ÁREAS DE ESTUDO.....	67
TABELA 3: RESULTADOS DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS OBTIDOS PARA AS SUBAMOSTRAS DE LÍQUIDO INTERSTICIAL DOS SEDIMENTOS COLETADOS EM UBATUBA E PARATY.	68
TABELA 4: RESULTADOS DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE ÁGUA SUPERFICIAL COLETADAS EM CADA ÁREA DE ESTUDO.....	69
TABELA 5: RESULTADOS DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE SEDIMENTOS <i>IN NATURA</i> COLETADOS EM CADA ÁREA DE ESTUDO.....	73
TABELA 6: DADOS DE ATIVIDADE ESTROGÊNICAS EM EQ-E2 PARA O ENSAIO <i>IN VITRO</i> YES DAS AMOSTRAS DE ÁGUA E SEDIMENTO COLETADAS EM RIO DAS OSTRAS.....	86
TABELA 7: RELAÇÃO DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS EM CADA PONTO AMOSTRAL A PARTIR DA IDENTIFICAÇÃO DE SIMILARIDADE DE PICOS CROMATOGRÁFICOS.	91
TABELA 8: VALORES DE EQ-E2 (NG.L ⁻¹) PARA AMOSTRAS DE ÁGUA, MATERIAL PARTICULADO E SEDIMENTO COLETADOS EM UBATUBA E PARATY, OBTIDOS PELO ENSAIO YES.	94
TABELA 9: RELAÇÃO DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS EM CADA PONTO AMOSTRAL A PARTIR DA IDENTIFICAÇÃO DE SIMILARIDADE DE PICOS CROMATOGRÁFICOS.	104
TABELA 10: RESULTADOS DE PERCENTUAL DE EFEITO OBSERVADO EM TODOS OS ENSAIOS DE BIODISPONIBILIDADE PROPOSTO PARA AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DIRETA E INDIRETA DE <i>M. JUNIAE</i> AOS DE.	107
TABELA 11: PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS ANALISADOS NO ENSAIO ECOTOXICOLÓGICO COM <i>MYSIDOPSIS JUNIAE</i>	108
TABELA 12: RESULTADOS DE EQ-E2 (NG.G ⁻¹) DOS SEDIMENTOS COM E SEM DOPAGEM E OS SOBRENADANTES DE CADA PONTO DO ENSAIO PRELIMINAR DE TRANSPORTE DE CONTAMINANTES.	110

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
1 OBJETIVOS	18
1.1 Geral	18
1.2 Específicos	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 Contaminantes de preocupação emergente.....	20
2.1.1 Desreguladores Endócrinos.....	20
2.1.2 Estrogênios naturais e sintéticos	21
2.1.3 Compostos fenólicos.....	21
2.2 Avaliação de contaminantes em ecossistemas aquáticos - sedimentar	22
2.2.1 Estuários	22
2.2.2 Sedimentos.....	23
2.3 Ensaio biológicos e químicos aplicados para investigação da contaminação de sedimentos.....	26
2.3.1 Bioensaios ecotoxicológicos <i>in vivo</i> – organismos usados e efeitos observados	26
2.3.2 Bioensaios <i>in vitro</i> – para predição de potencial de desregulação endócrina.....	30
2.4 Biodisponibilidade	32
2.4.1 Transporte de contaminantes	32
2.4.2 Sorção.....	33
2.5 Desafios Analíticos e Estratégias para a Quantificação de Micropoluentes em Sedimentos.....	35
2.5.1 Metodologias de extração de DE em amostras ambientais	35
2.5.2 Desafios e Avanços no Monitoramento e Regulação de Contaminantes de Preocupação Emergentes.....	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 Área de estudo	40
3.1.1 Rio das Ostras	41
3.1.2 Paraty	42
3.1.3 Ubatuba.....	43
3.2 Coleta das amostras de sedimento e água superficial.....	43
3.2.1 Procedimento de limpeza de vidraria.....	43

3.2.2	Procedimento de coleta e armazenamento de amostras de água superficial e sedimento	44
3.3	Procedimentos para preparo de amostras para ensaios analíticos no Cenário 1	49
3.3.1	Procedimentos para obtenção das subamostras de material particulado para realização do ensaio <i>in vitro</i> YES e análises cromatográficas	49
3.3.2	Preparo e obtenção de frações de amostras de sedimento para a realização de ensaios ecotoxicológicos e caracterização físico-química	49
3.3.3	Preparo das soluções-padrão dos DE	50
3.3.4	Métodos de extração das amostras de sedimento para ensaio <i>in vitro</i> YES e análise cromatográfica	50
3.3.4.1	Procedimento experimental do Método QuEChERS	51
3.3.4.2	Extração com solvente assistido por ultrassom (UAE)	52
3.3.4.3	Extração acelerada por solvente (ASE)	53
3.3.5	Preparo das amostras de água superficial para análises cromatográficas e ensaios <i>in vitro</i> YES	54
3.3.5.1	Extração em fase sólida (EFS)	54
3.3.6	Caracterização das amostras por parâmetros físico-químicos	55
3.3.7	Análises cromatográficas	56
3.3.8	Ensaio <i>in vitro</i> YES	58
3.3.9	Ensaio ecotoxicológicos	60
3.4	Procedimentos dos ensaios para estudo do Cenário C2	62
3.4.1	Ensaio ecotoxicológico de biodisponibilidade	62
3.4.2	Análises cromatográficas e ensaio YES para avaliação da biodisponibilidade	64
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1	Caracterização físico-química das amostras e subamostras de água superficial e sedimento das áreas de estudo - Cenário 1	65
4.2	Resultados dos ensaios ecotoxicológicos das amostras de sedimento e subamostras das áreas de estudo - Cenário 1	74
4.3	Avaliação comparativa de metodologias de preparo e extração de sedimentos para o ensaio <i>in vitro</i> YES	81
4.3.1	Amostras coletadas no município de Rio das Ostras	81
4.3.2	Amostras coletadas nos municípios de Ubatuba e Paraty	92
4.4	Respostas dos ensaios de biodisponibilidade para avaliação ecotoxicológica - Cenário 2	106

4.5 Transporte de contaminantes entre compartimentos no ensaio de biodisponibilidade - Cenário 2	109
4.6 Comparativo entre os cenários avaliados e proposta de novos métodos de análise de risco e legislação.....	112
5 CONCLUSÃO	114
REFERÊNCIAS.....	116

INTRODUÇÃO

Os sedimentos são componentes do ecossistema aquático, resultantes de interações bióticas, químicas, físicas e mineralógicas. Podem se comportar como depósito final de contaminantes ou como fontes secundárias de contaminação para o corpo d'água, devido a processos de dinâmica e ressuspensão (ESTEVES, 1988). Esta matriz altamente complexa, uma vez que processos como biogênese, biodegradação, biodisponibilidade e adsorção de diferentes contaminantes, incluindo desreguladores endócrinos, ocorrem em ambientes naturais.

Os desreguladores endócrinos (DE) pertencem a uma classe de contaminantes conhecidos micropoluentes, caracterizados por estarem presentes no ambiente em concentrações-traço. Por sua vez, os micropoluentes podem ser subdivididos em compostos regulamentados, com avaliação de seu potencial tóxico, e compostos ainda em fase de estudo para desenvolvimento de métodos de avaliação de risco, denominados de Contaminantes de Preocupação Emergente (*Contaminants of Emerging Concern* - CEC). Esses contaminantes têm sido amplamente estudados devido ao seu potencial risco à saúde humana ou ao ambiente, e por ainda não estarem sujeitos a critérios regulatórios de proteção ambiental. Mesmo em concentrações da ordem de ng. L⁻¹ a µg. L⁻¹, os DE podem causar efeitos adversos aos organismos e/ou ao ser humano (VOSGES et al., 2010; NIETO et al., 2017; KHAN, REHMAN e MALIK, 2020).

O monitoramento de DE em matrizes ambientais aquosas é amplamente abordado na literatura acadêmico-científica, com diversos estudos voltados à quantificação destes contaminantes em corpos d'água de distintas regiões ao redor do mundo (FINOTO VIANA et al., 2023; KANDIE et al., 2020; O'FLYNN et al., 2021; ZHAO et al., 2024). A literatura também aborda extensivamente seus efeitos na biota (GONSIOROSKI et al., 2020; VESELI et al., 2022; BAEKELANDT et al., 2023; LACOUTURE et al., 2023; MARIANA et al., 2023; MAI et al., 2024) e em seres humanos (KILCOYNE; MITCHELL, 2019; SABIR; AKHTAR; SALEEM, 2019; MEAKIN; BARRETT; ALEKSUNES, 2022; SYCHROVÁ et al., 2022). A proposta de controle para o lançamento, tratamento e remoção destes contaminantes no meio aquático tem motivado uma considerável produção científica a nível global (MULLA et al., 2020; VIEIRA et al., 2020; WANG et al., 2020).

Organizações internacionais, como por exemplo a *Water Research Australia*, estão desenvolvendo protocolos (projeto australiano ECHIDNA 1127) para estabelecer parâmetros que orientem a priorização do monitoramento contínuo de CEC em ambientes aquáticos, com base em seus riscos potenciais, destino, transporte e biodisponibilidade. Esses protocolos

também consideram o potencial estrogênico das substâncias (NEALE et al., 2023). No Brasil, ainda não há regulamentação quanto às concentrações seguras de DE em matrizes ambientais, nem há a obrigatoriedade do seu monitoramento, ainda assim a CETESB passou a avaliar a presença destes compostos no monitoramento de águas subterrâneas, sendo a primeira agência ambiental no Brasil a fazê-lo (CETESB, 2012).

Em contrapartida, ao avaliar a proporção dos estudos em matriz aquosa, verifica-se o atraso no monitoramento da presença e dos efeitos dos DE presentes no compartimento sedimento (FROEHNER et al., 2012; SERRA et al., 2019). Sendo assim, a definição de parâmetros que sirvam de subsídios para uma legislação específica para sedimentos está ainda mais distante. No entanto, a dinâmica de ambientes aquáticos pode favorecer a ressuspensão de DE presentes no sedimento, tornando-os biodisponíveis para uma grande gama de organismos, mesmos os pelágicos (ZHANG *et al.*, 2016). Ademais, esse compartimento atua como sumidouro de contaminantes, favorecendo a bioacumulação e biodisponibilidade de DE para os organismos aquáticos (SARDIÑA et al., 2019). A presença de contaminantes nos sedimentos indica a necessidade de aprofundar os estudos sobre os processos de transporte, distribuição, interação entre sedimento e contaminantes, bem como a biodisponibilidade desses contaminantes nessa matriz.

Um dos desafios para o avanço das pesquisas na área de micropoluentes em sedimento é o estabelecimento de metodologias analíticas de extração, identificação e quantificação dos analitos nessa matriz (BIAŁK-BIELIŃSKA et al., 2016). Como os sedimentos sofrem grande variação na composição granulométrica, mineralógica, teor de carbono orgânico e outras substâncias interferentes, há uma limitação na definição de métodos analíticos que quantifiquem precisamente a presença destes compostos. O efeito matriz observado em sedimentos resulta em baixa acurácia e baixa reprodutibilidade do método ao diminuir ou expandir o sinal ou a resposta do equipamento de análise (BRASIL, 2011; INMETRO, 2020).

Para superar os interferentes de efeito matriz, etapas subsequentes de purificação dos extratos devem ser aplicadas, assegurando a confiabilidade dos resultados e melhor desempenho dos métodos de análise aplicáveis, sejam ensaios biológicos ou químicos. O processo de validação da metodologia empregada tem como uma das principais funções avaliar o efeito matriz, garantindo que os resultados obtidos sejam representativos e coerentes com as condições reais do ambiente.

O estudo do transporte e mobilidade dos micropoluentes nos sedimentos depende do prévio conhecimento das propriedades físico-químicas dos compostos e as características dos sedimentos. A adsorção de micropoluentes em sedimentos varia conforme as propriedades tanto

dos adsorbatos, como coeficientes de partição octanol-água (K_{ow}), constante de acidez (pK_a), massa molecular, presença de anéis aromáticos, linearidade da molécula, grupos funcionais presentes, assim como as propriedades dos adsorventes, incluindo área superficial, tamanho e textura de poros, composição química superficial e composição de matéria mineral (RAKI et al., 2015). Sendo assim, a presença desses compostos nos sedimentos pode não afetar diretamente a qualidade ambiental e a saúde dos ecossistemas (FILIPKOWSKA et al., 2018), uma vez que sua biodisponibilidade pode ser reduzida devido à forte adsorção ao substrato e às características físico-químicas do sedimento (SANGSTER et al., 2016).

No entanto, a dinâmica de ambientes aquáticos pode favorecer a ressuspensão desses compostos, tornando-os biodisponíveis para uma ampla gama de organismos (ZHANG et al., 2016). Além disso, o efeito adverso desses compostos não é amplamente estudado em organismos epibentônicos, o que cria uma lacuna de informação quanto ao potencial ecotoxicológico (SNOW et al., 2015). Essa diversidade de fatores influencia diretamente a avaliação de risco e dos efeitos reais da contaminação de sedimentos por desreguladores endócrinos (SANGSTER et al., 2014). Portanto, é essencial estabelecer metodologias eficazes para quantificação desses compostos em sedimentos, compreender seu comportamento e transporte em ambientes aquáticos, o que é fundamental para a implementação de estratégias de monitoramento e o desenvolvimento de políticas públicas para o controle da poluição. Assim, o estudo da biodisponibilidade e dos processos de biodegradação desses compostos no ambiente é fundamental.

Considerando a relevância do estudo dos DE e, conseqüentemente, necessidade de desenvolver métodos analíticos eficazes para avaliar esses compostos em sedimento, esse trabalho teve como objetivo investigar a presença, as interações e o transporte destes compostos em sedimentos de ambientes dinâmicos estuarinos. Sendo necessário avaliar os impactos na sobrevivência e no comportamento de organismos pelágicos e bentônicos, tanto quando expostos direta, quanto indiretamente a esses compostos, em ambientes sedimentares controlados. A presente avaliação visa caracterizar os potenciais efeitos e o transporte trófico que o lançamento de DE pode causar em ambientes estuarinos.

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

O objetivo geral foi investigar os mecanismos de transporte e as interações dos desreguladores endócrinos (DE) em ambientes estuarinos, avaliando os efeitos ecotoxicológicos da exposição direta e indireta em organismos-teste. A partir disso, buscou-se elucidar um perfil de contaminação realista, que subsidiasse uma avaliação de risco ambiental e a formulação de diretrizes para a regulamentação de DE no ambiente.

1.2 Específicos

Cenário 1: Caracterização das áreas de estudo e avaliação da presença de DE e seus efeitos tóxicos em diferentes compartimentos ambientais

- Investigar a influência das condições ambientais nos processos de interação entre a água e os sedimentos.
- Investigar a influência da caracterização físico-química do sedimento na eficácia da extração dos DE, considerando o impacto do efeito matriz.
- Avaliar metodologias otimizadas para o preparo e a extração de DE em sedimentos, considerando a minimização de interferentes e aplicabilidade a diferentes matrizes ambientais;
- Avaliar a contaminação por DE nos sedimentos e na água superficial das áreas de estudo, integrando análises químicas e bioensaios;
- Estabelecer correlações entre os resultados de ecotoxicidade dos sedimentos e das águas superficiais das áreas de estudo, visando compreender as relações entre as características ambientais e os impactos dos DE.
- Investigar a influência da granulometria dos sedimentos estuarinos na detecção e avaliação dos impactos de DE.

Cenário 2: Avaliação do transporte, biodisponibilidade e efeitos tóxicos de DE em ambientes estuarinos

- Avaliar a biodisponibilidade de DE em ambientes estuarinos;
- Avaliar os efeitos da exposição direta e indireta aos contaminantes em ambiente estuarino por meio de ensaios ecotoxicológicos com o organismo-teste de coluna d'água *Mysidopsis juniae*;
- Investigar os mecanismos de transferência de contaminantes entre os compartimentos aquáticos.

- Comparar os resultados obtidos nos dois cenários para estabelecer um perfil de transporte de contaminantes nos sedimentos estuarinos para gerar dados que no futuro subsidiem a regulamentação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Contaminantes de preocupação emergente

2.1.1 Desreguladores Endócrinos

Micropoluentes orgânicos constituem uma classe de contaminantes presentes no ambiente em concentrações-traço. São classificados como Contaminantes de Preocupação Emergentes (*Contaminants of Emerging Concern* - CEC) quando ainda não estão sujeitos a monitoramento normatizado em legislação vigente. Exemplos destes compostos incluem produtos de higiene e uso pessoal, que abrangem fármacos não regulados (PPCPs), além de hormônios, plastificantes, filtros UV, fragrâncias e outras substâncias naturais e sintéticas.

Entre os micropoluentes, destaca-se a classe dos desreguladores endócrinos (DE), substâncias químicas que, mesmo em baixíssimas concentrações, são capazes de causar efeitos adversos ao sistema endócrino dos organismos (BILA e DEZOTTI, 2007). Estudos têm apontado os efeitos desses contaminantes na saúde humana e na biota (ALMAZROUEI et al., 2023; BABIĆ et al., 2018; FINCKH et al., 2022; KHAN, REHMAN e MALIK, 2020; WAN et al., 2022). Essas substâncias químicas são encontradas em diversas matrizes ambientais e biológicas, como água superficial e potável (ALVES et al., 2022), sedimentos (LIU et al., 2023), plantas, alimentos (TAN et al., 2022), biota (KLANCIC et al., 2022) e até em tecidos e fluidos humanos e animais (WEI et al., 2021). Schönfelder et al. (2002) e Takeuchi e Tsutsumi (2002) detectaram a presença de BPA parental em tecido placentário, tecido materno e plasma fetal, indicando uma elevada exposição humana a esses compostos.

Os compostos classificados como DE pertencem a diferentes classes químicas. Entre eles, destacam-se os pesticidas (ex: inseticidas, herbicidas e fungicidas), metais (como cádmio, mercúrio, chumbo, cromo), plastificantes (como bisfenol-A e ftalatos), surfactantes (ex: nonilfenol). Também são exemplos os estrogênios naturais, como 17 β -estradiol (E2), estrona (E1), estriol (E3), e estrogênio sintético, como o 17 α -etinilestradiol (EE2) presente em anticoncepcionais, além de subprodutos da degradação desses compostos.

Essas substâncias podem atingir ecossistemas costeiros por meio de diversas fontes pontuais e difusas, como os lançamentos de efluentes domésticos e industriais, lixiviados de aterros sanitários, deposição úmida a partir da atmosfera e escoamento superficial (GERBERSDORF et al., 2015). Uma das principais fontes de contaminação é o lançamento de esgoto doméstico *in natura* em corpos hídricos, que representa um dos grandes problemas ambientais no Brasil (FROEHNER et al., 2012; LARA-MARTÍN et al., 2015; FUSI et al., 2016; DAI et al., 2018). Embora aproximadamente metade do esgoto doméstico gerado pela

população brasileira (50,8%) seja direcionada a estações de tratamento de esgotos (SNIS, 2021), as técnicas convencionais de tratamento não são eficientes na remoção completa de micropoluentes (BILA e DEZOTTI, 2007). Dessa forma, mesmo efluentes tratados podem apresentar concentrações residuais de DE, resultando em efeitos tóxicos crônicos em diferentes fases do ciclo de vida dos organismos expostos (BILA e DEZOTTI, 2007).

2.1.2 Estrogênios naturais e sintéticos

Os estrogênios constituem uma das categorias de desreguladores endócrinos mais estudadas devido a sua alta potência relativa e aos efeitos deletérios em organismos expostos. Esses estrogênios podem ser de origem natural ou sintética. Dentre os estrogênios naturais, destacam-se a estrona (E1), o 17β -estradiol (E2), o estriol (E3). Entre os estrogênios sintéticos, o 17α -etinilestradiol (EE2) é amplamente utilizado, sendo prescrito principalmente em contraceptivos e em terapias de reposição hormonal (MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017). Em virtude de sua relevância e lançamento constante nos ambientes, esses compostos foram selecionados como analitos de interesse para este estudo.

2.1.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos constituem uma extensa classe de desreguladores endócrinos, frequentemente encontrados no ambiente devido à sua ampla aplicação em produtos industriais e comerciais. Entre os principais exemplos, destacam-se o bisfenol A (BPA) e o nonilfenol (4NP), ambos bastante estudados por seus efeitos adversos ao ambiente e à saúde de organismos.

O bisfenol A é uma substância sintética utilizada como plastificante na fabricação de policarbonato e resina epóxi, sendo encontrado em uma variedade de produtos, incluindo revestimentos de latas, equipamentos de segurança, embalagens, resinas odontológicas, papéis térmicos e outros utensílios (RUBIN, 2011). A contaminação por BPA está associada a diversos efeitos adversos, como a indução da feminização dos peixes, répteis e pássaros, além de alterações no processo de espermatogênese (CRAIN et al., 2007).

O nonilfenol (4NP) é um surfactante não iônico utilizado em resinas fenólicas, aditivos plásticos, detergentes, emulsificantes e formulações de pesticidas. Estudos indicam que a exposição ao 4NP pode reduzir a taxa reprodutiva de organismos em experimentos de laboratório, comprometer o sistema imunológico (KIM, 2014) e induzir a produção de

vitelogenina em peixes machos expostos às baixas concentrações deste contaminante (MIYAGAWA et al., 2016).

2.2 Avaliação de contaminantes em ecossistemas aquáticos - sedimentar

2.2.1 Estuários

Estuários são corpos d'água costeiros semifechados, conectados ao oceano e sujeitos à diluição mensurável de água marinha por água doce proveniente da drenagem continental. O aporte de água fluvial é essencial, pois, na ausência de diluição da água marinha, o ambiente não é caracterizado como estuarino (BARROSO, 2019). A conectividade com o mar, permanente ou periódica, influencia a circulação hidrodinâmica (marés e ondas) e a distribuição biológica nesses ambientes. Por tanto, são ambientes aquáticos dinâmicos complexos, caracterizados por interações bióticas e abióticas entre todos os compartimentos ambientais (YÁNEZ-ARANCIBIA et al, 1993). Os estuários são de difícil classificação, pois apresentam variações temporais em sua forma, tamanho e amplas variações nas condições que vão desde ambientes fluviais a marinhos.

Sua classificação pode variar de acordo com o regime de marés e correntes, que influenciam diretamente a salinidade e a densidade das águas de entrada (NAGELKERKEN et al., 2000). A maré é o principal mecanismo de mistura nos estuários, pois induz a circulação de massas de água, gradientes de salinidade e processos de erosão e deposição (BIANCHI, 2007). Ademais, a interação entre balanço hídrico e evaporação altera a salinidade do ambiente, podendo resultar em águas salobras, salinas ou hipersalinas e ainda variando de forma estratificada em relação a zona de mistura (LANA et al., 2006). No entanto, apenas o aspecto morfodinâmico e de perfil de salinidade não são suficientes para classificação completa do estuário. Aspectos relacionados à qualidade da água e aos impactos antrópicos da região, são relevantes para classificação mais efetiva para assegurar o equilíbrio ecossistêmico local (LEMLEY et al., 2015).

Devido à sua rica biodiversidade de espécies e pelo deságue nos mares e oceanos, são considerados ecossistemas de extrema relevância ecológica. No entanto, o crescimento populacional desordenado, e o desenvolvimento das grandes cidades com processo de industrialização, mineração, agricultura e pecuária acarretam mudanças significativas nas classes de uso e ocupação dos solos nas adjacências de regiões estuarinas. Essas mudanças introduzem efeitos de redução do volume de água nos rios e conseqüentemente no aporte fluvial aos estuários (MAUAD et al., 2015). Esta redução ocorre devido a processos de erosão, assoreamento, desflorestamento, desabamentos de encostas e outros que afetam as populações

e acarretam a perda de biodiversidade. Sendo assim, o critério sanitário, a qualidade estética, parâmetros físicos, químicos e biológicos precisam ser monitorados para garantir a qualidade da água no estuário (LEMLEY et al., 2015).

Ambientes estuarinos contribuem para aporte de sedimentos e outros materiais das bacias hidrográficas para os oceanos, principalmente estuários de pequena área. Como conseguinte, muito esforço é despendido para obter dados sobre a variabilidade dos fatores condicionantes em relação aos processos naturais, antrópicos e mudanças climáticas. O aporte de material particulado oriundo de ressuspensão em estuários pode ser mensurado através da medição de sólidos suspensos em fase aquosa destes ambientes. No Brasil, os rios que compõem esses sistemas frequentemente transportam grandes volumes de esgoto doméstico, reflexo da deficiência no saneamento brasileiro (CARVALHO, 2015; ARAÚJO et al., 2021). Por esta razão, os estudos de contaminação precisam averiguar não só as águas superficiais dos estuários, mas também os sedimentos e material particulado. Sabendo-se que os estuários brasileiros recebem constantes aportes de poluentes, se faz necessário investigar a presença de desreguladores endócrinos nestes ambientes.

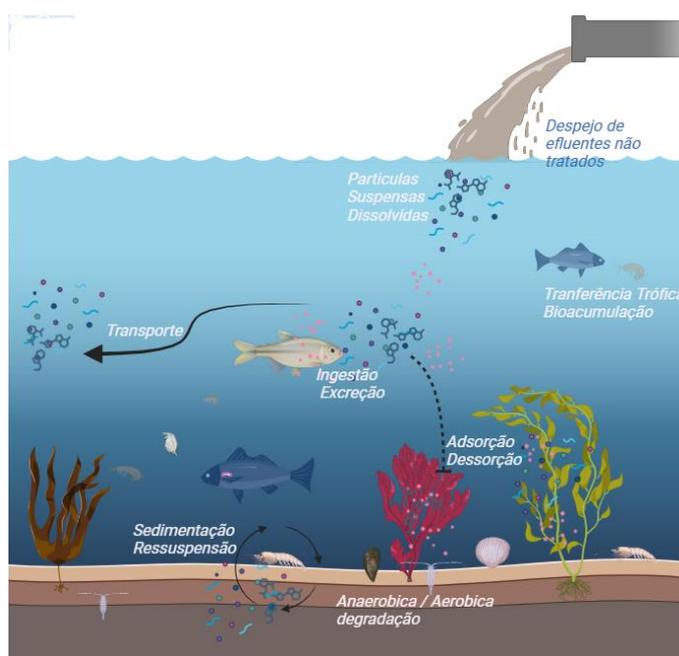
2.2.2 Sedimentos

Os corpos hídricos atuam como receptores de cargas poluidoras oriundas de diversas fontes antropogênicas. Em virtude disso, recebem grande esforço científico para a compreensão e preservação dos ambientes aquáticos. Os impactos causados pelos poluentes são influenciados por fatores climáticos, condições locais, como densidade populacional, taxas de liberação e padrões de dispersão dos poluentes, além da variabilidade espacial e temporal das concentrações e da sensibilidade das espécies no ecossistema receptor (PASCHOAL, 1996). Com isto, esses ambientes frequentemente contêm misturas complexas de compostos químicos cuja toxicidade não pode ser atribuída a elementos isolados, visto que interações sinérgicas e antagônicas podem modificar os efeitos tóxicos, tornando-os superiores, inferiores ou equivalentes à soma de suas partes.

Os sedimentos em ambientes aquáticos apresentam quatro componentes principais, sendo eles: a água intersticial, a fração inorgânica, a matéria orgânica e substâncias de origem antropogênica. A avaliação da contaminação dos sedimentos e seus impactos sobre as comunidades aquáticas emprega ferramentas integradas, como estudos de bioacumulação, biomarcadores, análises da estrutura de comunidades bentônicas, medições químicas e testes

de toxicidade. Esses métodos fornecem uma visão abrangente da qualidade do sedimento e de seus efeitos no ecossistema (ANDERSON et al., 1996). A matéria orgânica, embora apresente grande variabilidade em massa na constituição do sedimento, desempenha papel crucial na regulação da adsorção e biodisponibilidade de contaminantes.

Nos ambientes costeiros, a dinâmica oceanográfica pode favorecer o transporte de contaminantes, envolvendo processos como ressuspensão, sedimentação e adsorção, que podem torná-los biodisponíveis ao longo da cadeia alimentar (LIU et al., 2023), como pode ser visto na Figura 1. Essa biodisponibilidade representa um risco, visto que organismos epibentônicos e pelágicos podem ingerir partículas contaminadas, resultando em efeitos deletérios decorrentes dessa exposição (GIAMAKI et al., 2023; WAN et al., 2022).



Fonte: Elaborado pela autora BioRender ® (2022)

Figura 1: Esquema dos processos de transporte e acumulação de poluentes em ambientes aquáticos.

Os sedimentos, devido às suas características físico-químicas, que favorecem a adsorção de contaminantes hidrofóbicos provenientes de lançamento de efluentes não tratados, são considerados um compartimento-chave no monitoramento da poluição ambiental por DE (SARDINA et al., 2019). Os sedimentos interagem intensamente com a matriz aquosa, tornando essencial considerar a dinâmica dos ambientes aquáticos para identificar áreas potencialmente contaminadas. Estudar compartimentos de forma isolada não proporciona uma visão integrada do ambiente.

Parte da interação dos sedimentos com a fase aquosa ocorre a partir dos elementos que compõem o líquido intersticial. Sendo assim, o estudo desta subamostra, obtida a partir dos sedimentos, permite identificar a biodisponibilidade dos contaminantes, ou seja, a fração dos

poluentes que pode ser absorvida e provocar efeitos adversos na biota aquática. Esse compartimento é altamente relevante, pois reflete as interações entre fases sólidas e líquidas do sedimento, influenciadas pela composição orgânica, o pH e as condições redox locais. Com isso, a análise do líquido intersticial fornece uma perspectiva crítica sobre o papel dos sedimentos na dinâmica ambiental de poluentes, facilitando a predição do risco ecológico e o desenvolvimento de estratégias de remediação.

Outra forma de analisar os sedimentos é a partir do preparo de elutriatos. Esta metodologia consiste em avaliar os contaminantes presentes no sedimento que se tornam biodisponíveis para a coluna de água. Usualmente é preparada uma mistura de proporção de massa de sedimento por volume de diluente (majoritariamente de 1:2; 1:4; 1:10) submetida a uma agitação por determinado período curto em condições controladas de temperatura e velocidade. O sobrenadante desta mistura é removido e submetido às análises necessárias. Inicialmente esta metodologia foi proposta para avaliação de efeitos de dragagem de sedimentos na coluna d'água (USEPA, 2001). No entanto, vem sendo utilizada como ferramenta de avaliação da qualidade da água quando há ressuspensão seja por processos naturais (bioperturbação, regime hidrológico) ou antropogênico (dragagem) do sedimento.

Esta subamostra de sedimento apresenta limitações de expressão de resultados, uma vez que o diluente usado como extrator influencia na quantificação de determinado composto alvo. Outros fatores limitantes são o uso de diferentes tempos de agitação, diferentes processos de mistura e temperatura permitidos na elutriação. Sendo assim, há constantes variações de procedimentos para diferentes analitos a serem obtidos a partir dos sedimentos, gerando um fator de incerteza quanto a caracterização completa da contaminação do sedimento (USEPA, 2001). Por haver a separação do sobrenadante para análise, esse extrato acaba não representando as condições reais do ambiente quanto aos mecanismos de ressuspensão de contaminantes do sedimento para a coluna d'água.

Tendo em vista a complexidade e importância do monitoramento da qualidade destes ambientes, é questionável a presença ou não de contaminantes de preocupação emergentes em sedimentos estuarinos, considerando as interações e os diversos compartimentos dispostos. Estudos têm investigado a presença de DE em sedimentos com distintas composições, analisando seus efeitos na biota e os riscos associados à exposição humana (ARIS et al., 2014; BABIĆ et al., 2018; FROEHNER et al., 2012; KHAN, REHMAN e MALIK, 2020; NIETO et al., 2017; TIŠLER et al., 2016; VOSGES et al., 2010). Os resultados mostram que esses podem causar danos ecotoxicológicos, favorecer a bioacumulação em organismos expostos e, até mesmo resultar na biomagnificação ao longo das cadeias tróficas (FAN et al., 2019).

Embora sejam de grande importância, poucos estudos têm investigado a contaminação de sedimentos marinhos por contaminantes de preocupação emergentes no Brasil. Um dos principais estudos publicados analisou estrogênios em sedimentos superficiais de manguezal expostos a esgoto doméstico não tratado (FROEHNER et al., 2012). Os resultados indicaram que todas as amostras apresentaram a presença de 17- α -etinilestradiol (EE2), variando de 0,45 a 129,78 ng. g⁻¹. Além disso, uma revisão realizada por Aris et al. (2014) destacou que as maiores concentração de EE2, E1 e E2 em sedimentos analisados no mundo foram encontrados no manguezal de Itacorubi, no Brasil, com valores de 133,64 ng. g⁻¹, 50,75 ng. g⁻¹, e 40,96 ng. g⁻¹, respectivamente (FROEHNER et al., 2012; ARIS; SHAMSUDDIN; PRAVEENA, 2014).

2.3 Ensaios biológicos e químicos aplicados para investigação da contaminação de sedimentos

2.3.1 Bioensaios ecotoxicológicos *in vivo* – organismos usados e efeitos observados

Os bioensaios têm o objetivo avaliar os efeitos biológicos de contaminantes por meio da exposição de organismos-tese a diferentes matrizes ambientais ou amostras fortificadas em condições controladas em laboratório. Esses ensaios permitem identificar potenciais impactos nos organismos expostos, bem como em suas gerações futuras, contribuindo para a compreensão dos riscos ambientais associados à presença dessas substâncias químicas no ambiente.

Os ensaios de toxicidade desempenham um papel importante no diagnóstico da qualidade ambiental e no controle da poluição. A complexidade, execução e duração desses ensaios podem variar. Nos ensaios de ecotoxicidade aguda, por exemplo, os efeitos são analisados ao longo de todo o ciclo de vida do organismo-tese. Esses ensaios geralmente utilizam organismos com ciclos de vida curtos, o que permite a obtenção de resultados em um período curto de duração. As principais respostas avaliadas incluem a mortalidade e a imobilidade dos indivíduos expostos.

Em contraste, os ensaios crônicos têm como objetivo avaliar os efeitos de exposições prolongadas a contaminantes. Esses testes analisam alterações no crescimento, reprodução e comportamento dos organismos-teste. Realizados, geralmente, com organismos de ciclo de vida mais longo, os ensaios crônicos são fundamentais para compreender os efeitos persistentes e fornecer informações sobre os riscos ambientais a longo prazo.

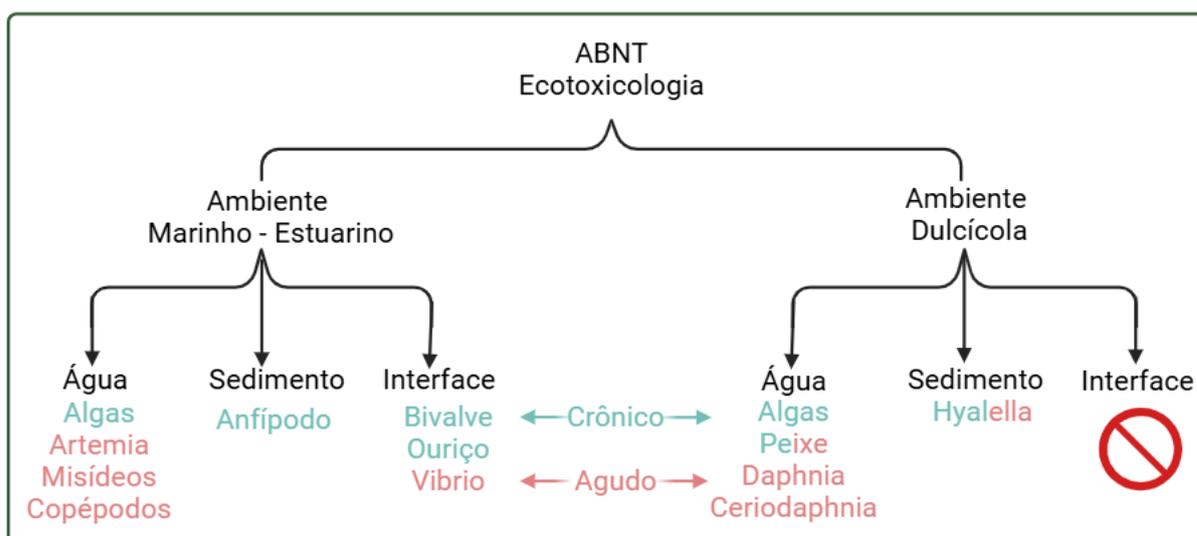
Os esforços científicos em Ecotoxicologia Aquática tradicionalmente focaram na caracterização dos efeitos tóxicos na coluna d'água, resultantes da contaminação de origem terrestre. Contudo, observa-se um reconhecimento crescente de que a contaminação localizada em sedimentos pode gerar impactos adversos significativos nos ecossistemas aquáticos, especialmente na estrutura das comunidades epibentônicas (PRÓSPERI, 2002). Esses efeitos frequentemente estão associados às interações na interface sedimento/água superficial.

Em virtude dessa interação, a proteção da qualidade dos sedimentos passou a ser considerada uma extensão natural da proteção da qualidade da água (Environment and Climate Change Canada - ECCC, 2022). Os sedimentos não apenas desempenham um papel essencial como habitat para inúmeros organismos aquáticos, mas também atuam como reservatórios de diversos compostos químicos persistentes introduzidos no ambiente. Estudos geoquímicos, realizados tanto em campo quanto em laboratório, indicam que os sedimentos possuem um alto potencial de formar associações com diferentes classes de poluentes antropogênicos (ARAÚJO, 2005). Nesse contexto, os sedimentos funcionam simultaneamente como reservatórios de contaminantes e potenciais fontes de contaminação para a coluna d'água.

No entanto, a presença de níveis elevados de contaminantes nos sedimentos não implica necessariamente em efeitos adversos diretos sobre a biota aquática. A manifestação desses impactos depende de uma série de fatores que regulam a biodisponibilidade dos poluentes, influenciando, conseqüentemente, sua toxicidade. Ademais, é importante destacar que sedimentos contendo misturas de contaminantes podem produzir efeitos tóxicos distintos daqueles observados para contaminantes isolados, exigindo uma abordagem diferenciada para sua avaliação. No Brasil, a legislação ambiental não exige o monitoramento da ecotoxicidade de sedimentos, apenas aponta na Resolução CONAMA N° 454, de 1° de novembro de 2012 (BRASIL, 2012) uma diretriz para monitorar apenas em caso de dragagem.

No Brasil, as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) estabelecem as principais metodologias para o monitoramento da toxicidade em efluentes e matrizes ambientais. Essas metodologias são amplamente adotadas e exigidas por agências de fiscalização ambiental, como a Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler (FEPAM) no Rio Grande do Sul e a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), garantindo a padronização e a confiabilidade dos procedimentos analíticos.

A elaboração, adaptação e revisão dessas metodologias são conduzidas pela Comissão de Estudo Especial de Análises Ecotoxicológicas da ABNT (ABNT/CEE-106). Essa comissão, composta por especialistas de diversas áreas, inclui representantes de universidades, laboratórios, indústrias, agências ambientais e consultores técnicos. Há mais de duas décadas, esse grupo dedica-se ao desenvolvimento contínuo das metodologias, promovendo a atualização e a adequação às demandas científicas e regulatórias. A Figura 2 exemplifica as metodologias vigentes para ensaios crônicos e agudos aplicados para diferentes ambientes segundo a salinidade local e o compartimento ambiental a ser avaliado.



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Figura 2: Esquema representativo das normativas brasileiras usadas para avaliação ecotoxicológica, crônica e aguda, para compartimentos ambientais isolados e interface.

Todavia, os procedimentos normatizados propõem uma avaliação compartimentada dos ambientes aquáticos. Propondo uma avaliação aguda ou crônica de contaminação de água apenas afetando organismos de coluna d'água, e de sedimentos apenas afetando organismos bentônicos. Porém, como explorado no item 2.2 deste documento, os ambientes aquáticos são dinâmicos sofrendo com variações de marés, correntes e outros fenômenos, propiciando a migração dos contaminantes de uma matriz para outra. Esta característica afeta a biodisponibilidade dos contaminantes para organismos bentônicos e pelágicos e os sinergismos dos contaminantes com componentes intrínsecos da matriz.

Os ensaios ecotoxicológicos com líquido intersticial e elutriato são amplamente empregados para avaliar a toxicidade em espécies aquáticas, como organismos bentônicos e pelágicos, revelando potenciais impactos em níveis tróficos diferentes e ajudando a extrapolar possíveis riscos à cadeia alimentar. Apesar de ambas as metodologias visarem elucidar a

biodisponibilidade de contaminantes, a ecotoxicidade de água intersticial é usualmente maior que a de elutriato em ensaios clássicos (RIOS et al., 2012; ITRC,2011; ALMEIDA, 2010; USEPA, 2001). Não obstante, um desafio persistente reside na variabilidade da metodologia de preparo das amostras, que pode influenciar significativamente a precisão dos resultados, sobretudo em ambientes complexos e heterogêneos. Nesse contexto, é fundamental desenvolver e padronizar técnicas de fracionamento de sedimentos que assegurem a representatividade e reprodutibilidade dos ensaios.

Ensaio ecotoxicológicos variam em relação aos *endpoints* observados, desde *screening* até análises abrangendo todo o ciclo de vida do organismo. Alguns medem parâmetros extremos como sobrevivência, crescimento e reprodução, mas frequentemente não consideram um efeito a níveis subcelulares ou teciduais. A análise de risco de desreguladores endócrinos requer a definição de modo de ação endócrino (MoA) plausível, conectado a efeitos adversos relevantes em nível populacional (CHOI et al., 2024; MARTY et al., 2017). Por essa relação entre esses parâmetros e os efeitos populacionais frequentemente permanecer incerta, os ensaios ecotoxicológicos clássicos para desreguladores endócrinos não representam os efeitos desses contaminantes no ambiente (WAGNER et al., 2017). A Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) e a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA) estruturaram diretrizes que incluem ensaios de *screening*, voltados a efeitos subletais a nível subcelular, e testes de longa duração, que avaliam efeitos populacionais e desregulação endócrina. Alguns estudos apresentados no SETAC Pellston Workshop® "*Ecotoxicological Hazard and Risk Assessment Approaches for Endocrine-Active Substances (EHRA)*", identificaram diversos parâmetros potencialmente relevantes para o sistema endócrino em moluscos, peixes, anfíbios, aves e mamíferos (MARTY et al., 2017).

Sendo assim novas metodologias vêm sendo elaboradas para avaliar de forma mais eficiente as respostas ecotoxicológicas de ambientes contaminados com compostos de preocupação emergentes. A OECD (2024), por exemplo, elaborou um documento com modificações nos *endpoints* observados no ensaio clássico com cladóceras (*Daphnia sp.*) e nos períodos de exposição dos organismos-teste aos DE. O documento aponta para um grande surgimento de machos nos cultivos expostos a diferentes concentrações de DE. Ressalta ainda que a modificação morfológica acontece após um tempo de exposição superior ao período de 48 h usualmente aplicado nos ensaios agudos. Desta forma, pode-se ressaltar que a metodologia atualmente aplicada para avaliação de risco ambiental com uso de CE50 para substâncias isoladas não expressa efetivamente os danos ambientais que os DE podem ocasionar no ambiente.

Como alternativa, as metodologias *in silico* têm ganhado destaque por sua eficiência em prever a toxicidade de compostos químicos, reduzindo custos, tempo e questões éticas relacionadas ao uso de animais. O termo *in silico* refere-se à simulação computacional de problemas biológicos, baseada no princípio de que compostos com estruturas semelhantes apresentam comportamentos similares. Esses modelos podem ser aplicados ao design de fármacos, à avaliação de riscos ambientais e à análise toxicológica de substâncias.

Entre as abordagens metodológicas utilizadas na modelagem *in silico*, destacam-se a Relação Estrutura-Atividade (SAR), Relação Estrutura-Atividade Quantitativa (QSAR), formação de categorias, métodos de extrapolação e interpolação, redes neurais artificiais e árvores de decisão. Essa abordagem representa um avanço significativo na toxicologia, proporcionando ferramentas preditivas para a avaliação de riscos e o desenvolvimento sustentável. Entretanto, ainda carecem de informações das respostas ecotoxicológicas *in vivo* e *in vitro* para subsidiar os modelos computacionais.

Roy e Khan (2021) publicaram um capítulo de livro com diretrizes para novos ensaios e mecanismos de monitoramento de DE no ambiente usando aplicações de ferramentas *in silico*, principalmente a relação quantitativa entre estrutura-atividade (QSAR), na detecção precoce de possíveis contaminantes de preocupações emergentes usando dados de ecotoxicidade de bactérias marinhas. Estes autores ainda ressaltam a importância do uso de modelagem da ecotoxicidade de bactérias marinhas e sua aplicação na estimativa precoce de diferentes contaminantes ambientais usando QSARs. O trabalho é pautado para construções de novos modelos para avaliação de risco ambiental destes compostos.

2.3.2 Bioensaios *in vitro* – para predição de potencial de desregulação endócrina

Bioensaios *in vitro* são técnicas que envolvem o uso de organismos, como bactérias, fungos, algas e crustáceos, além de componentes subcelulares, como suspensões celulares, culturas de tecidos, culturas celulares, enzimas e proteínas. Seu objetivo é substituir ensaios com animais ou atuar como etapas preliminares em estudos toxicológicos *in vivo*, complementando-os e aprimorando sua sensibilidade e especificidade (BEDNARCZUK, 2010). São testes realizados em laboratório utilizando células isoladas ou tecidos para medir os efeitos de uma substância em determinado mecanismo de resposta (MoA) (FOUYET et al., 2024). Esses ensaios podem não refletir totalmente as características de um composto da mesma

forma que os métodos *in vivo*, mas eles se concentram em pontos finais interação com receptores específicos, seja por ativação ou por inibição (BEDNARCZUK, 2010).

O desenvolvimento de ensaios *in vitro* para avaliar a desregulação endócrina enfrenta desafios devido à complexidade do sistema endócrino e à diversidade de mecanismos pelos quais desreguladores podem causar efeitos adversos. Uma das principais dificuldades é a identificação de parâmetros relevantes para mensuração.

Os bioensaios que utilizam receptores de hormônios para avaliar os efeitos agonistas e antagonistas dos DE são frequentemente aplicados. A ação agonista ocorre quando o DE mimetiza um estrogênio e elucida uma resposta, enquanto a ação antagonista ocorre quando o DE se liga ao receptor de estrogênio, bloqueando e impedindo a elucidação da resposta (BILA; DEZOTTI, 2007; GHISELLI e JARDIM, 2007; OMS, 2012). Entre os DE, as substâncias químicas que atuam na via metabólica do receptor de estrogênio merecem especial atenção.

Entre os ensaios *in vitro* de atividade estrogênica, destacam-se:

(i) Ensaios de ligação a ligantes (*ligand-binding assays*): detectam interações receptor-ligante de forma competitiva, quantificando a capacidade de uma substância de se ligar ao receptor de estrogênio em substituição ao estradiol (E2), sem diferenciar agonistas de antagonistas;

(ii) Ensaios de proliferação celular (*E-screen*): avaliam a proliferação dependente do receptor de estrogênio, comumente usando células MCF-7 de carcinoma humano;

(iii) Ensaios de gene repórter: utilizam a transfecção de um construto repórter em células de mamíferos ou leveduras para avaliar a ativação do receptor de estrogênio (GEA et al., 2022; WANGMO et al., 2018).

Os ensaios de gene repórter subdividem-se em dois grupos:

(a) Células com receptor de estrogênio endógeno: a ativação é medida pela expressão do gene repórter, como nos ensaios MELN (células MCF-7), T47D-KBluc e T47Dluc (células T47D) (ROBITAILLE et al., 2022; WANGMO et al., 2018);

(b) Células sem receptor endógeno: requerem transfecção tanto do receptor de estrogênio quanto do elemento de resposta de estrogênio (ERE). Exemplos incluem o ER-CALUX® (células U2-OS), ER-GeneBLAzer (células HEK293) e hER α -HeLa-9903. Esses ensaios com leveduras incluem *Saccharomyces cerevisiae* (YES), *Arxula adeninivorans* (A-YES) e *Photobacterium luminescens* (BLYES).

Um exemplo de bioensaios utilizado para avaliar a atividade estrogênica em sedimentos é o ensaio *in vitro* YES (Yeast Estrogen Screen) (BERTIN et al., 2020; CUNHA et al., 2020; MÜLLER et al., 2019). O ensaio YES é um bioensaio *in vitro* de ativação transcricional do receptor de estrogênio que utiliza um gene repórter do receptor de estrogênio humano (RE α) integrado ao genoma da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996). A atuação dos esteróides ocorre quando estes atravessam a membrana plasmática e se ligam a receptores intracelulares específicos (YING; KOOKANA; RU, 2002). O 17 β -estradiol (E2) é o estrogênio mais potente, devido à sua alta afinidade pelos receptores estrogênicos (RUGGIERO; LIKIS, 2002). Assim, bioensaios *in vitro* são utilizados para quantificar a atividade estrogênica de substâncias, mistura ou amostras ambientais (GOMES, et al, 2023).

2.4 Biodisponibilidade

2.4.1 Transporte de contaminantes

O transporte de contaminantes de preocupação emergentes nos ambientes aquáticos é influenciado por suas propriedades físico-químicas, como solubilidade em água, pressão de vapor, polaridade, constante de Henry, coeficiente de partição octanol-água (Kow) e constante de partição carbono-orgânico (Koc). Estudos de partição e sorção de micropoluentes são fundamentais para a compreender seu comportamento ambiental, uma vez que a partição entre as fases aquosa e particulada está diretamente relacionada ao destino, aos mecanismos de transporte e dispersão, além de influenciar sua biodegradabilidade e biodisponibilidade (ARGOLO *et al.*, 2020).

Essas propriedades determinam como os contaminantes se distribuem entre os compartimentos ambientais, afetando seu movimento, persistência e interação com os diferentes componentes do ecossistema (SCHWARZENBACH, GSCHWEND & IMBODEN, 2003). A hidrofobicidade, uma característica diretamente influenciada pelo Kow e Koc, desempenha papel central no comportamento desses compostos. Contaminantes mais hidrofóbicos tendem a se associar preferencialmente às fases sólida e orgânica do sedimento, enquanto compostos hidrofílicos permanecem predominantemente na fase aquosa. Em sistemas estuarinos, fatores como a salinidade, a presença de matéria orgânica dissolvida e a dinâmica das partículas em suspensão podem alterar significativamente os processos de transporte, incluindo fluxos entre o sedimento e a coluna d'água.

. Compostos com valores de Kow inferiores a 1,5 possuem elevada solubilidade em água, e, portanto, são menos propensos a se acumular nos sedimentos (ALVES et al., 2017). A

adsorção de micropoluentes nos sedimentos varia conforme as propriedades dos adsorbatos, como os coeficientes de dessorção (K_d), partição octanol-água (K_{ow}), a constante de acidez (pK_a), a massa molar, a presença de anéis aromáticos, a linearidade da molécula e os grupos funcionais presentes. Os compostos com maior peso molecular e alto K_{ow} e K_d são mais fáceis de serem absorvidos em sedimentos e de se concentrarem em organismos vivos. Além disso, as características dos adsorventes, como área superficial, tamanho e textura de poros, composição química superficial e a natureza da matéria mineral desempenham um papel fundamental nesse processo (RAKI et al., 2015).

Com isso, temos que a biodisponibilidade dos desreguladores endócrinos está intrinsecamente ligada ao equilíbrio entre as fases sólida e líquida do ambiente, sendo fortemente influenciada pela constante de partição carbono-orgânico (K_{oc}). O K_{oc} reflete o potencial de um contaminante de se associar ao carbono orgânico presente nos sedimentos e solos, modulando sua disponibilidade para organismos aquáticos. Por outro lado, o coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) é amplamente utilizado como preditor da lipossolubilidade e bioacumulação dos contaminantes em tecidos biológicos, especialmente aqueles ricos em lipídios (Schwarzenbach et al., 2003). Valores elevados de K_{ow} indicam maior tendência de bioacumulação e toxicidade em organismos aquáticos. Em estuários, onde o aporte de matéria orgânica detrítica é elevado, e os sedimentos finos ricos em carbono orgânico predominam, a biodisponibilidade pode ser intensificada. Condições ambientais específicas, como o pH, a salinidade e a presença de substâncias competidoras, também desempenham um papel crítico, alterando a interação entre os contaminantes e os organismos expostos.

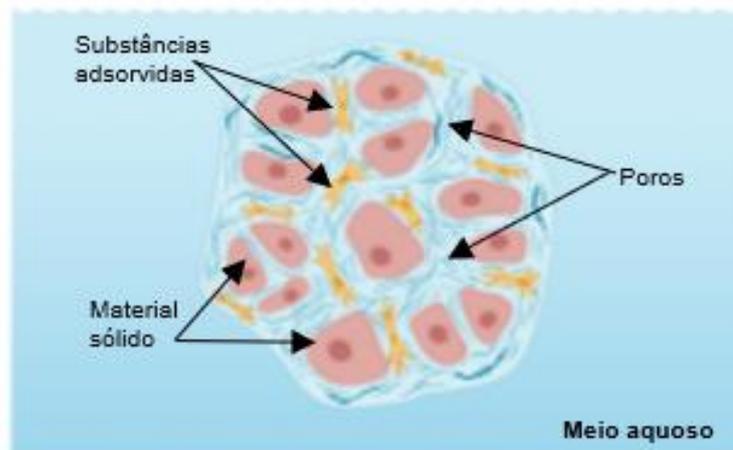
2.4.2 Sorção

Os processos de sorção, que incluem adsorção e absorção, são fundamentais para compreender o destino dos contaminantes nos ambientes aquáticos. A sorção descreve a associação de substâncias químicas com superfícies sólidas, sendo governada por fatores como a área superficial, o tamanho dos poros e a densidade do adsorvente, além das propriedades do adsorvato, como polaridade, solubilidade e tamanho molecular (COONEY, 1999; MCKAY, 1996). As características dos sedimentos influenciam diretamente a adsorção de contaminantes nessa matriz ambiental. No caso da adsorção, as substâncias se acumulam na interface sólido-líquido, regulando tanto sua retenção quanto sua liberação no ambiente. Em zonas estuarinas, a competição por sítios de adsorção entre diferentes contaminantes e substâncias naturais, como ácidos húmicos e fúlvicos, pode influenciar significativamente o processo, alterando a biodisponibilidade e a toxicidade.

O teor de matéria orgânica, por exemplo, favorece a adsorção de substâncias orgânicas e inorgânicas aos sedimentos (ARGOLO, 2023). Contudo, esse mesmo parâmetro pode aumentar a incerteza nas medições analíticas, uma vez que atua como um forte interferente para ensaios *in vitro* (BIAŁK-BIELIŃSKA et al., 2016). Nesse contexto, o desenvolvimento de metodologias de preparo de amostras de sedimentos, que combine métodos eficientes na remoção de interferentes com a preservação dos analitos de interesse, permanece um desafio para o monitoramento da poluição em ambientes sedimentares.

Por outro lado, o processo inverso, conhecido como dessorção, refere-se à liberação dos contaminantes previamente adsorvidos para a fração aquosa. Este fenômeno é particularmente relevante em sistemas dinâmicos, como estuários, onde alterações nas condições ambientais, como mudanças na salinidade e no pH, podem mobilizar contaminantes da matéria orgânica dissolvida ou do material particulado suspenso (MCKAY, 1996). A dessorção também é potencializada por processos físicos, como a ressuspensão de sedimentos durante eventos de alta energia, como tempestades e atividades antrópicas, possibilitando a redistribuição dos compostos no sistema aquático. Assim, a sorção e a dessorção são processos interdependentes que determinam não apenas a retenção, mas também a mobilização dos contaminantes, influenciando diretamente seu transporte, biodisponibilidade e impacto ambiental.

A Figura 3 apresenta de forma esquemática os processos de adsorção e absorção em grãos de material sólido, exemplificando os sedimentos em contato com matriz aquosa.



Fonte: Elaborado pela autora, BioRender ® 2024.

Figura 3: Esquema dos processos de adsorção e absorção em grãos de material sólido, exemplificando os sedimentos em contato com matriz aquosa.

2.5 Desafios Analíticos e Estratégias para a Quantificação de Micropoluentes em Sedimentos

Os sedimentos constituem uma matriz ambiental de alta complexidade devido à sua ampla variação em sua composição granulométrica, mineralógica, teor de carbono orgânico e presença de substâncias interferentes. Essas características dificultam a definição de métodos analíticos capazes de quantificar com precisão a presença de compostos, uma vez que o efeito matriz compromete a acurácia e a reprodutibilidade dos resultados analíticos, interferindo na intensidade do sinal ou na resposta do equipamento de análise (BRASIL, 2011; INMETRO, 2020).

Um dos principais desafios na pesquisa de micropoluentes em sedimento reside na elaboração de metodologias analíticas robustas para extração, identificação e quantificação desses analitos (BIAŁK-BIELIŃSKA et al., 2016). Com base na literatura, foram identificadas e avaliadas abordagens metodológicas para otimizar e validar técnicas de análise em diversas matrizes ambientais, incluindo sedimentos (LARA-MARTÍN et al., 2015; COMBI et al., 2013; COMBI et al., 2016; PINTADO-HERRERA et al., 2016; CHIAIA-HERNÁNDEZ et al., 2020).

2.5.1 Metodologias de extração de DE em amostras ambientais

O método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) foi originalmente desenvolvido para análise multirresíduo de pesticidas, sendo publicado pela

primeira vez por Anastassiades et al. (2003). Este método apresenta vantagens como rapidez, simplicidade, custo reduzido, eficácia, robustez e segurança (PRESTES et al., 2009).

Inicialmente, o QuEChERS envolve uma extração inicial utilizando 10 g de amostra com 10 mL de acetonitrila (ACN), seguida por uma etapa de partição líquido-líquido promovida pela adição de 4 g de MgSO₄ anidro. A adição de sais promove o efeito “salting out” que aumenta as recuperações de analitos mais polares ao reduzir a solubilidade desses compostos na fase aquosa e minimizar a quantidade de água na fase orgânica.

A remoção de água residual e o *clean-up* são realizadas simultaneamente por meio da extração em fase sólida dispersiva (dispersive solid-phase extraction – d-SPE). Nessa etapa, 150 mg de MgSO₄ anidro e 25 mg PSA (amina primária e secundária, grupos etilenodiamina-N-propil ligados à sílica) são adicionados a 1 mL de extrato. O PSA desempenha a função de remover interferentes como açúcares, ácidos graxos, ácidos orgânicos e pigmentos (ANASTASSIADES et al., 2003; ANDRADE, 2013).

O método de Extração Acelerada por Solvente (ASE, *Accelerated Solvent Extraction*) é amplamente utilizado para a extração de DE em matrizes ambientais, como sedimentos. Essa técnica emprega solventes orgânicos em altas temperaturas e pressões controladas, o que resulta em extrações rápidas e eficientes dos analitos de interesse, superando métodos convencionais.

A ASE funciona aquecendo o solvente acima de seu ponto de ebulição normal em uma câmara pressurizada, permitindo maior penetração na matriz sedimentar e solubilização eficaz dos compostos alvo. Suas principais vantagens incluem redução do tempo de extração, menor consumo de solvente e elevada recuperação de DE, que frequentemente apresentam interações complexas com sedimentos.

Essa eficácia torna a ASE particularmente relevante na análise de DE, considerando-se sua persistência ambiental e potencial bioacumulativo. Esses compostos podem ser liberados de sedimentos para a coluna d'água, representando riscos à biota aquática. Estudos têm demonstrado que a ASE fornece resultados consistentes e reprodutíveis, consolidando-a como uma ferramenta robusta para avaliação de risco e monitoramento ambiental de contaminantes de preocupação emergente.

2.5.2 Desafios e Avanços no Monitoramento e Regulação de Contaminantes de Preocupação Emergentes

Nos últimos anos, contaminantes de preocupação emergentes têm despertado crescente interesse da comunidade científica e agências regulatórias. Esses contaminantes são compostos que ainda não estão incluídos em programas normativos de monitoramento, nem são abrangidos por legislações ambientais. Tal lacuna decorre da incerteza quanto aos seus efeitos na biota e da dificuldade na detecção e quantificação no ambiente. Esse cenário tem impulsionado investimentos em pesquisas para determinar concentrações seguras e desenvolver estratégias de monitoramento das fontes de lançamento destes compostos.

O estudo de Purí *et al.* (2023) apresenta uma visão abrangente das atuais políticas e estruturas globais voltadas à avaliação de contaminantes emergentes, destacando o estado-da-arte e as perspectivas futuras. Entre os exemplos de iniciativas internacionais, estão as diretrizes de agências reguladoras como USEPA, Conselho de Controle de Recursos Hídricos do Estado da Califórnia (*California's State Water Resources Control Board*), *Toxic Substances Control Act* (TSCA) e o *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos.

Adicionalmente, o Ministério de Infraestrutura e Meio Ambiente (I&M) dos Países Baixos, em parceria com a Agência de Resíduos Públicos da Região Flamenga da Bélgica (OVAM), desenvolveu medidas para regular, monitorar e remediar determinadas classes de DE no ambiente.

No Brasil, ainda não há regulamentação específica que defina concentrações seguras de micropoluentes em matrizes ambientais ou que obrigue o seu monitoramento. Contudo, iniciativas pioneiras têm sido conduzidas, como a da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), que utiliza ensaios biológicos específicos para avaliar a presença de compostos com atividade estrogênica em águas superficiais e subterrâneas. Entre eles, destacam-se o ensaio *in vitro* BLYES (*Bioluminescent Yeast Estrogen Screen*), que avalia a atividade estrogênica, e o ensaio *in vitro* GR-CALUX, para compostos glicocorticóides (CETESB, 2018).

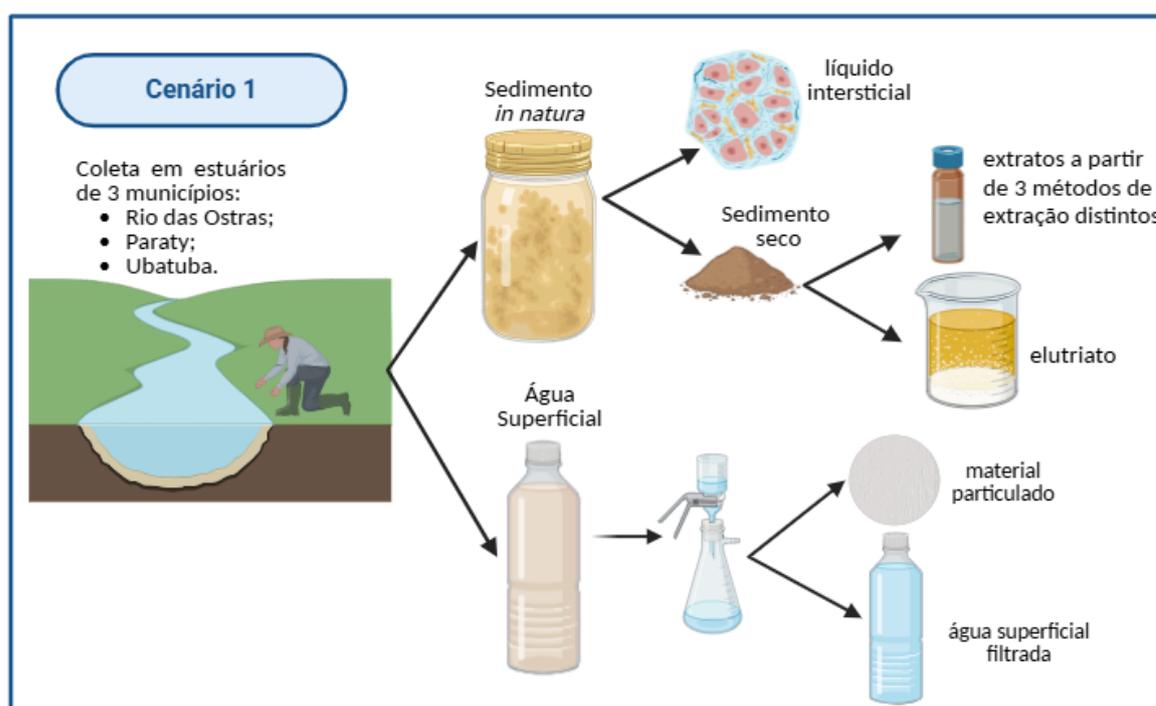
O ensaio BLYES, desenvolvido por Sanseverino *et al.* (2005), utiliza a levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada com receptor estrogênico humano, permitindo a detecção de substância potencialmente desreguladoras endócrinas por meio de uma resposta bioluminescente. De forma semelhante, o ensaio YES (*Yeast Estrogen Screen*), desenvolvido por Routledge e Sumpter (1996), utiliza o mesmo mecanismo de ação, porém apresenta uma resposta colorimétrica. O ensaio YES foi recentemente normatizado pela

International Organization for Standardization sendo criado o documento ISO 19040-2:2018. Com base nesta publicação, a Comissão de Estudos Ecotoxicológicos da ABNT (CEE-106) elaborou adaptações desta diretiva para aplicação do ensaio em âmbito nacional. O documento elaborado segue em consulta nacional, ABNT NBR ISSO 19040-1:2024, para posterior publicação.

Com isso, a delimitação de ensaios padronizados para detecção e quantificação de DE em diferentes matrizes é fundamental para entender a amplitude de contaminação que estes compostos atingem no meio ambiente e propor ensaios que consigam efetivamente avaliar os efeitos destes contaminantes considerando ambientes naturais dinâmicos com efeitos sinérgicos e mudanças sazonais. Os ambientes estuarinos não apresentam regulamentações para o monitoramento de sua qualidade ambiental, e por serem de grande relevância para saúde pública e da biota, precisam ter esse cenário de monitoramento e legislação modificado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi estruturado em dois cenários de execução, de modo a tornar as etapas mais compreensíveis e facilitar a análise das abordagens adotadas. O primeiro, chamado de Cenário 1 (C1), consistiu na caracterização das áreas de estudo, com o objetivo de estabelecer um panorama da contaminação e da dispersão dos DE nos compartimentos ambientais avaliados. Para isto, foram preparadas subamostras a partir dos sedimentos e das águas coletadas. Durante esta fase do estudo, foram avaliadas três técnicas de preparo das subamostras de sedimento para posterior análises química e biológica, buscando minimizar a interferência da matriz nas respostas dos ensaios, conforme Figura 4.

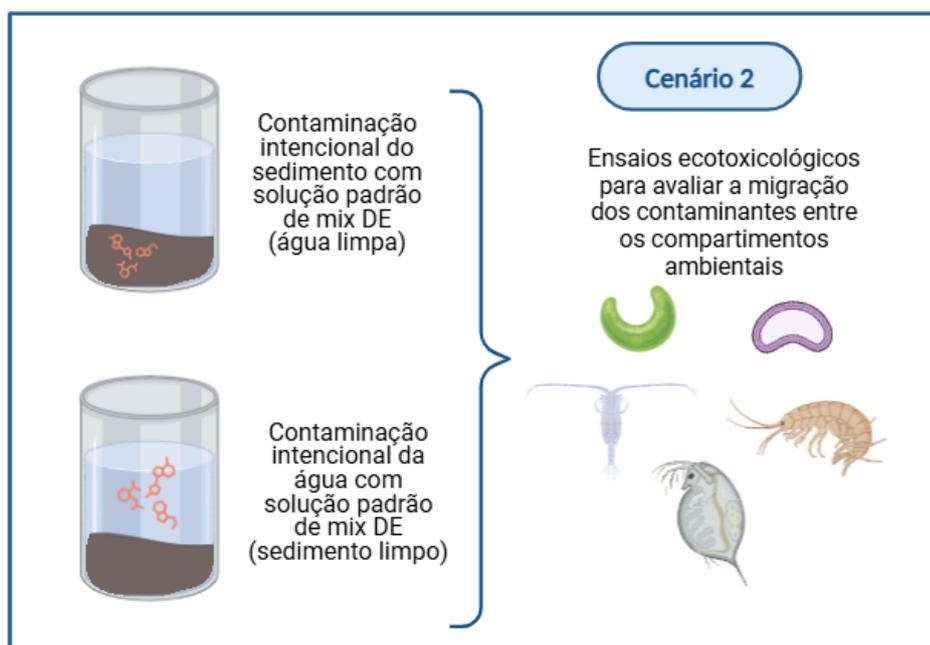


Fonte: Elaborado pela autora, BioRender ® 2024.

Figura 4: Esquema representativo do Cenário 1: Caracterização das amostras de sedimento *in natura* e água superficial coletadas nas áreas de estudo e avaliação de metodologias de preparo e extração.

No Cenário 2 (C2), utilizou-se um único tipo de sedimento, coletado na área de estudo em Paraty, para as análises de biodisponibilidade de DE. Optou-se por sedimentos estuarinos orgânicos, visando elucidar a dinâmica ambiental de um estuário reconhecido como berçário de diversas espécies (BEDÊ, 2011; MOREIRA et al., 2011). Além disso, esse sedimento é amplamente adotado como referência em ensaios ecotoxicológicos padronizados no Brasil (COSTA, 2010; MOLISANI et al., 2012). Essa etapa foi fundamental para identificar limitações nos protocolos ecotoxicológicos para a análise de DE, os quais subsidiam as avaliações de risco. Essa abordagem visou investigar ferramentas que simulam, de forma mais realista, os modelos

de dinâmica local. O esquema apresentado na Figura 5 sintetiza a discussão levantada nas etapas analíticas empregadas no Cenário 2.

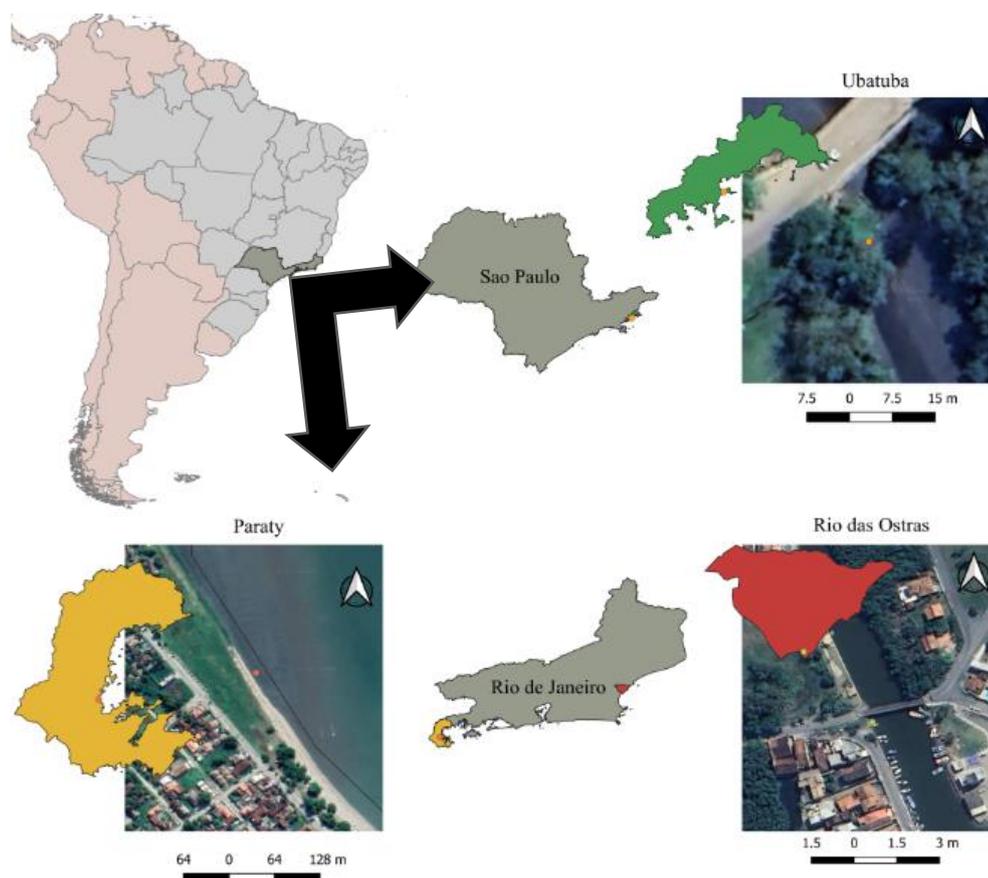


Fonte: Elaborado pela autora, BioRender ® 2024.

Figura 5: Esquema representativo do Cenário 2: Uso de sedimento estuarino de Paraty para avaliação do efeito da biodisponibilidade de contaminantes sobre a toxicidade em organismos-teste padronizados. Contaminantes

3.1 Área de estudo

O estudo foi conduzido em três cidades da região Sudeste do Brasil, localizadas em dois estados. As áreas estuarinas selecionadas possuem relevância econômica e turística, sendo monitoradas para identificar a presença de DE em sedimentos e água superficial. Este item detalha os estuários selecionados, cuja localização geográfica em relação aos municípios, estado e ao país está apresentada na Figura 6.



Fonte: Elaborado por José Rafael, 2023

Figura 6: Esquema de localização das áreas geográficas delimitadas para o estudo.

3.1.1 Rio das Ostras

O primeiro município selecionado para o estudo foi Rio das Ostras (RdO), localizado na Costa do Sol do estado do Rio de Janeiro. Seu território abrange 28 km de praias, o município é atravessado pelo rio que dá o nome a cidade, com 15 km de extensão. Rio das Ostras ocupa a 21ª posição em densidade demográfica (461,38 hab/km²) e apresenta o maior índice de crescimento populacional do estado (IBGE, 2022). Apenas 37,4% da população é atendida pelo sistema de esgotamento sanitário, com três ETE e um emissário submarino (SNIS, 2022). O município não possui Política Municipal relacionada ao saneamento e nem Plano Municipal de Saneamento Básico (PMSB).

Uma pesquisa realizada pelo Ministério da Saúde apresentou as informações de que 92,21% dos domicílios do município têm o sistema de fossa como tratamento de esgoto, 4,68% dos domicílios estão ligados a rede pública de esgoto e 3,12% o esgoto a céu aberto. O estuário do rio das Ostras está inserido na região hidrográfica da bacia de São João. O rio corta o município sendo corpo receptor de efluentes tratados pela ETE mais antiga que atende ao

município, bem como de efluente *in natura* das regiões não incorporadas ao sistema de saneamento básico local.

A bacia hidrográfica do rio das Ostras está localizada no setor sudeste do litoral do estado do Rio de Janeiro. A área de estudo está localizada entre 22° 7' S - 22°32'S e 42°34'W - 41°38'W, coordenadas geográficas e sua área total de drenagem é de 157 km². É composta por três rios, das Ostras, Iriri e Jundiá, entre os quais o mais importante é o das Ostras. Esta é uma região turística importante e o aumento da população tem causado uma diminuição da qualidade da água. O rio das Ostras percorre toda a cidade, chegando a ser o que recebe a maior quantidade de efluentes não tratados (BARROSO E MOLISANI, 2019; PRIOSTE, 2007; RIO DAS OSTRAS, 2004). Esta zona estuarina apresenta elevados níveis de salinidade provenientes das afluições oceânicas que se estendem por 6 km rio acima.

3.1.2 Paraty

A Praia do Jabaquara, localizada no setor sudoeste da Baía da Ilha Grande, abriga uma extensa área de manguezal situada a aproximadamente 2 km do centro histórico de Paraty, nas coordenadas 23°14'12.8"S e 44°42'37.1"W. Esse manguezal é reconhecido por seu bom estado de conservação e é frequentemente utilizado como fonte de sedimentos de referência para estudos ecotoxicológicos devido à sua função ecológica e à integridade ambiental. Contudo, com a construção de uma estrada principal que conecta a região à Rodovia Rio-Santos e o aumento da influência antrópica, esta área passou a ser impactada por despejo de esgoto, o que representa um risco crescente à sua biodiversidade e à qualidade ambiental (BEDÊ, 2011).

Dados do último Censo do IBGE indicam que o município de Paraty tem apresentado um crescimento populacional significativo, acompanhado por um aumento na demanda por infraestrutura de saneamento básico, especialmente em áreas turísticas como a Praia do Jabaquara. Embora o município tenha se esforçado para expandir os serviços de saneamento, os índices ainda revelam deficiências na cobertura, com apenas 31% do município ligado à rede coletora de esgoto com posterior tratamento, o que contribui para a entrada de efluentes domésticos no ecossistema local. Esse cenário ressalta a necessidade de ações de gestão que integrem o planejamento urbano com a preservação ambiental, visando mitigar os impactos sobre o manguezal e assegurar a sustentabilidade das fontes de sedimentos de referência para ensaios ecotoxicológicos.

3.1.3 Ubatuba

A Baía de Ubatuba localiza-se no setor norte do litoral do estado de São Paulo, no sudeste do Brasil. A região abriga o porto da cidade de Ubatuba, um importante centro turístico impactado pela crescente influência antrópica. Voltada para o leste e protegida das ondas vindas do sul e sudoeste no mar aberto, a baía possui uma saída delimitada pela Ponta do Respingador e pela Ponta Grossa. Divide-se em duas partes: a parte interior, que se estende da linha de costa até os 10 m de profundidade e apresenta baixa movimentação hidrodinâmica; e a parte externa, entre 10 e 16 m de profundidade, sujeita a influência de correntes e ondas do mar aberto (SANTOS & PIRES-VANIN, 2004).

A Baía de Ubatuba apresenta sedimentos superficiais de fundo bastante heterogêneos, variando de sedimentos grosseiros ao norte e leste a sedimentos finos ao noroeste (MAHIQUES, 1995). O restante da baía é coberto por silte grosso e médio. A entrada de sedimentos fluviais é fortemente dependente do regime de chuvas, levando a uma maior contribuição durante o verão, resultando em maiores teores de carbono na parte central da baía (MAHIQUES ET AL., 1998).

A área de estudo está localizada entre 23°25'S - 23°27'S e 45°01'W - 45°03'W. Quatro rios deságuam na baía, influenciando a qualidade de suas águas, todos impactados por emissários de esgoto. Entre eles, o rio Acaraú é considerado a principal fonte de contaminação (CETESB, 1996). A entrada de esgoto, proveniente do aumento de conjuntos habitacionais ao longo da costa, está crescendo rapidamente, evidenciada pelo aumento nos índices de coliformes fecais na área. Esse fenômeno é particularmente intenso em períodos chuvosos, quando grandes volumes de esgoto não tratado são lançados da cidade de Ubatuba, e durante períodos de férias (BURONE ET AL., 2003).

3.2 Coleta das amostras de sedimento e água superficial

3.2.1 Procedimento de limpeza de vidraria

Para evitar interferentes e a contaminação das amostras, todas as vidrarias usadas na extração e no preparo de amostras para os ensaios analíticos e ecotoxicológicos, assim como as vidrarias utilizadas na coleta, foram submetidas a um procedimento de limpeza utilizado no Laboratório de Engenharia Sanitária (LES) da UERJ. Este procedimento assegura que as baixas concentrações de compostos quantificadas nos ensaios cromatográficos e de atividade estrogênica provenham exclusivamente da matriz analisada, minimizando a contaminação cruzada de outras fontes. As etapas desse procedimento são: lavar com água potável; imergir

por 24h em solução de detergente (Extran®/Merck) a 5%; esfregar e enxaguar 10 vezes com água potável; rinsar com acetona (grau ACS, Tedia); e enxaguar 5 vezes com água ultrapura obtida do sistema Milli-Q® (Merck-Millipore).

3.2.2 Procedimento de coleta e armazenamento de amostras de água superficial e sedimento

Amostras de água superficial e sedimento foram coletadas nas regiões estuarinas dos três municípios selecionados durante a estação chuvosa, abrangendo os rios Acaraú, Tavares, Grande, Indaiá na cidade de Ubatuba; a praia do Jabaquara na cidade de Paraty e rio das Ostras na cidade de Rio das Ostras. A partir dessas duas matrizes, foram geradas subamostras em laboratório. As amostras de material particulado (MP) foram obtidas por filtração das amostras de água superficial, enquanto o líquido intersticial foi retirado do sedimento *in natura*. Além disso, foram preparados elutriatos a partir de amostras do sedimento seco.

As amostras de água superficial foram coletadas em frascos âmbar de 1 L previamente descontaminados (conforme item 4.2.1) para as análises cromatográficas e de atividade estrogênica (ensaio *in vitro* YES), e em frascos plásticos de 1 L para as demais análises. Todas as amostras foram preservadas em cooler com gelo até a chegada ao laboratório. As alíquotas de água para a caracterização físico-química e os ensaios ecotoxicológicos foram mantidas em geladeira a 4 °C obedecendo os tempos de estocagem estipulados para cada método (APHA, 2023) e NBR 15469 (ABNT, 2021), respectivamente. As amostras de água para o ensaio YES e análise cromatográfica foram imediatamente acidificadas a pH 2 com HCl e armazenadas em geladeira a 4 °C por até 48 h, quando foi realizado o preparo das amostras.

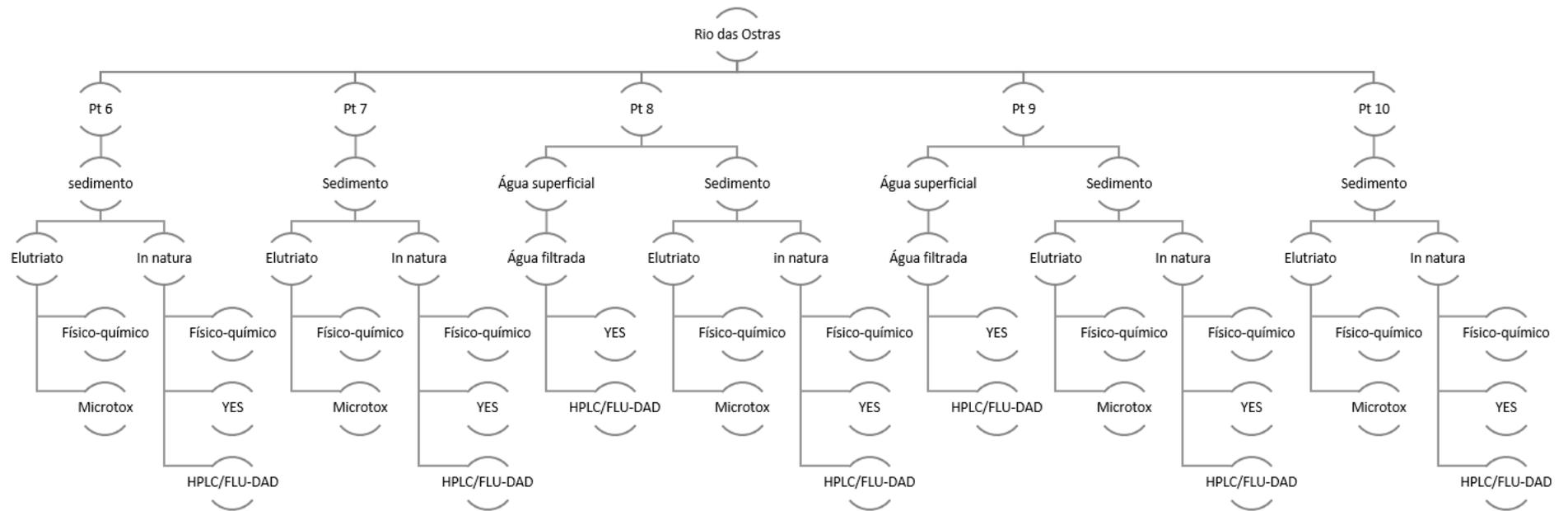
Os sedimentos foram coletados com auxílio de pás previamente descontaminadas (conforme item 4.2.1) em sacos de coleta comerciais. A camada mais superficial do sedimento foi descartada, sendo coletada a camada com profundidade de aproximadamente 5 cm. Cada amostra de sedimento coletada foi homogeneizada manualmente por 10 minutos e, em seguida, separada em alíquotas para cada análise. As frações destinadas à extração foram transferidas para recipientes inertes com capacidade de 500 mL, enquanto as alíquotas para caracterização físico-química e os ensaios ecotoxicológicos foram mantidas nos sacos de coleta.

Devido à variação das marés, alguns pontos investigados neste estudo não permitiram a coleta de amostras de água superficial, sendo possível coletar apenas sedimentos. As informações de cada compartimento ambiental analisado em cada ponto de coleta estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Descrição dos pontos de coleta com os compartimentos ambientais avaliados, coordenadas geográficas, município de origem e data de coleta.

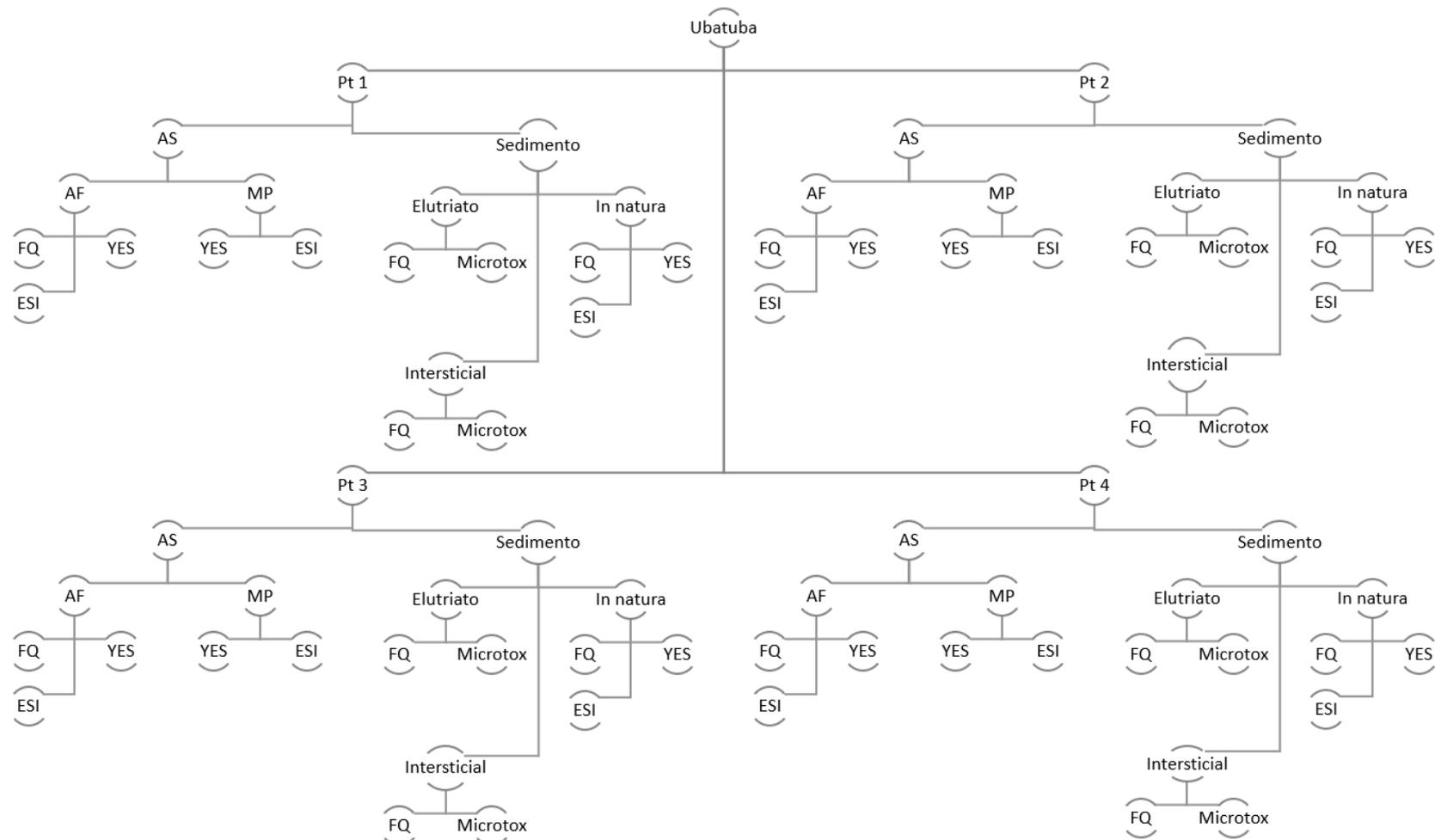
PT	Matriz	Município	Estuário	Coordenadas do ponto de coleta	Descrição	Data de Coleta
1	água superficial	Ubatuba	do rio Indaiá	-23,4162682	no limiar da praia com a vegetação de mangue	outubro de 2022
	sedimento			-45,0526283		
2	água superficial	Ubatuba	do rio Grande	-23,431255	parte mais interna do manguezal e parte mais externa no curso da praia	outubro de 2022
	sedimento			-45,0686441		
3	água superficial	Ubatuba	do rio Tavares	-23,446973	parte interna do rio que tem encontro com a praia	outubro de 2022
	sedimento			-45,0681313		
4	água superficial	Ubatuba	do rio Acaraú	-23,4593038	parte interna do manguezal na foz do rio	outubro de 2022
	sedimento			-45,0549194		
5	água superficial	Paraty	Baia Carioca	-23,2038211	na praia de Jabaquara	outubro de 2022
	sedimento			-44,7189363		
6	sedimento	Rio das Ostras	do rio das Ostras	-22,5316172 -41,9351531	na parte mais interna do manguezal na foz do rio	março de 2022
7	sedimento	Rio das Ostras	do rio das Ostras	-22,5316172 -41,9351531	na parte mais externa do manguezal na foz do rio	março de 2022
8	água superficial	Rio das Ostras	do rio das Ostras	-22,5324984	na foz do rio em sua maré baixa bem próximo ao seu espelho d'água	março de 2022
	sedimento			-41,9345339		
9	água superficial	Rio das Ostras	do rio das Ostras	-22,5324984	na foz do rio em sua maré baixa bem próximo ao seu leito mais seco	março de 2022
	sedimento			-41,9345339		
10	sedimento	Rio das Ostras	do rio das Ostras	-22,5290068	no leito do rio próximo ao atracamento de barcos pesqueiros em sua parte mais interna	março de 2022
				-41,9362016		

As amostras coletadas nos pontos indicados na Tabela 1 foram submetidas a procedimentos analíticos distintos, tanto no preparo das subamostras quanto nas análises a que foram submetidas. O organograma apresentado nas Figura 7, 8 e 9 representa, respectivamente, os procedimentos analíticos e as amostras coletadas em Rio das Ostras, Ubatuba e Paraty.



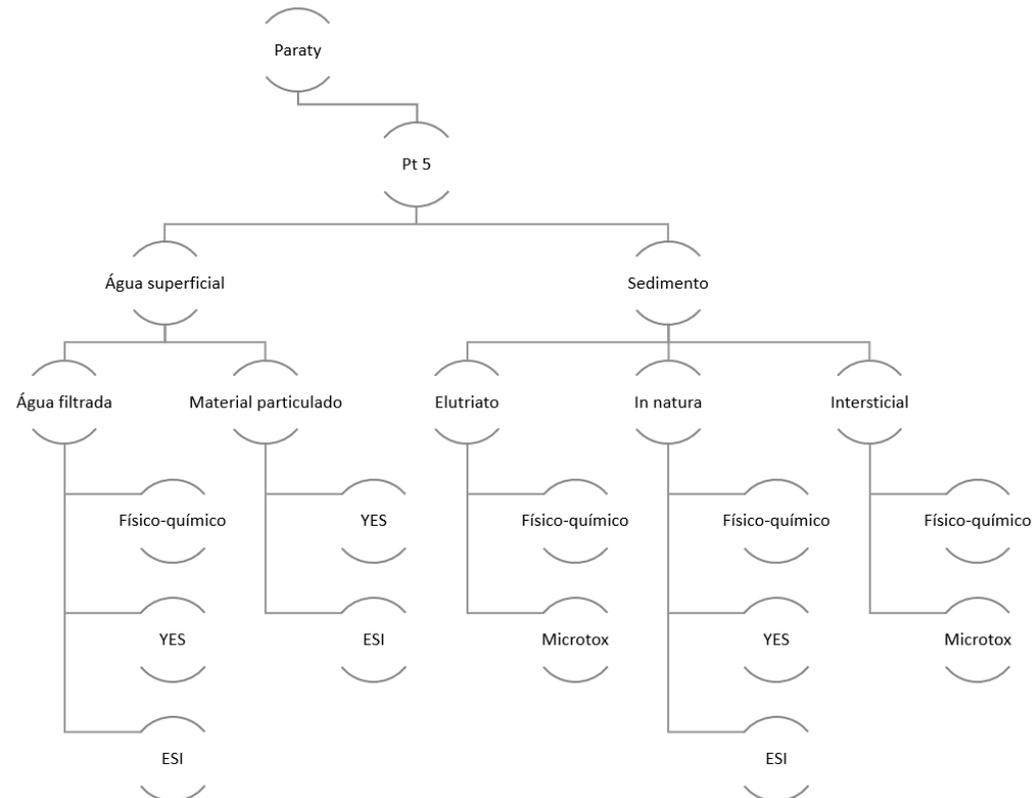
Legenda: FQ - parâmetros físico-químicos; AS - água superficial; AF - água filtrada; MP - material particulado; YES - ensaio de atividade estrogênica; ESI - cromatografia LC/MS-MS-ESI; Microtox - ensaio ecotoxicológico.

Figura 7: Organograma com as subamostras geradas a partir de cada matriz coletada em Rio das Ostras e as respectivas análises realizadas em cada subamostra.



Legenda: FQ - parâmetros físico-químicos; AS - água superficial; AF - água filtrada; MP - material particulado; YES - ensaio de atividade estrogênica; ESI - cromatografia LC/MS-MS-ESI; Microtox - ensaio ecotoxicológico.

Figura 8: Organograma com as subamostras geradas a partir de cada matriz coletada em Ubatuba e as respectivas análises realizadas em cada subamostra.



Legenda: FQ - parâmetros físico-químicos; AS - água superficial; AF - água filtrada; MP - material particulado; YES - ensaio de atividade estrogênica; ESI - cromatografia LC/MS-MS-ESI; Microtox - ensaio ecotoxicológico.

Figura 9: Organograma com as subamostras geradas a partir de cada matriz coletada em Paraty e as respectivas análises realizadas em cada subamostra.

3.3 Procedimentos para preparo de amostras para ensaios analíticos no Cenário 1

3.3.1 Procedimentos para obtenção das subamostras de material particulado para realização do ensaio *in vitro* YES e análises cromatográficas

As amostras de água superficial, analisadas por meio do ensaio YES e de análises cromatográficas, foram preparadas conforme descrito por Argolo et al. (2021). Inicialmente, 1L de cada amostra foi filtrada utilizando membranas Millipore com porosidades de 0,7 μm (GF) e 0,45 μm (MCE). As membranas de 0,7 μm contendo material particulado (sólidos suspensos), foram submetidas à extração ultrassônica acelerada por solvente (item 4.1.9.3).

3.3.2 Preparo e obtenção de frações de amostras de sedimento para a realização de ensaios ecotoxicológicos e caracterização físico-química

Amostras de sedimentos foram manualmente homogeneizadas e separadas em partes iguais para a realização dos da caracterização físico-química, ensaios biológicos e análises cromatográficas. O fracionamento de sedimentos *in natura* para a obtenção de líquido intersticial e elutriato representa uma metodologia fundamental para a avaliação ecotoxicológica e a compreensão da biodisponibilidade de contaminantes em ambientes aquáticos.

O líquido intersticial, composto pela fase aquosa retida entre as partículas de sedimento, é um compartimento essencial para o entendimento da mobilidade e disponibilidade de contaminantes. Neste estudo, em alguns pontos foi extraído por separação física/mecânica frações intersticiais para análise físico-química e ecotoxicológica com a bactéria *Vibrio fischeri*. O processo foi realizado em centrífuga a 1495 rpm por 40 minutos. Em seguida o sobrenadante foi separado com uso de pipeta para um novo recipiente até que fosse analisado.

Por sua vez, o elutriato, obtido pela agitação e filtração do sedimento em uma solução controlada, simula a liberação de contaminantes potencialmente bioativos e representa uma fração que pode ser mobilizada para a coluna d'água em eventos de ressuspensão, como tempestades e atividades antropogênicas. Esta metodologia foi aplicada para os ensaios ecotoxicológicos, usando a proporção de 1:4 (v/peso seco) de cada ponto de sedimento coletado e com a solução de NaCl 2% (m/v), a qual é a solução diluente do ensaio com a bactéria *Vibrio fischeri*.

Para garantir análises mais precisas e sensíveis, é importante considerar que o sedimento pode conter interferentes que afetam os resultados dos ensaios químicos ou biológicos. Por esses motivos, tornou-se necessário aplicar metodologias capazes de minimizar a influência

desses interferentes. Assim, as frações de sedimento coletadas no Cenário 1, destinadas ao ensaio *in vitro* YES e às análises cromatográficas, foram submetidas a três diferentes procedimentos de extração de contaminantes, descritos nos itens seguintes.

3.3.3 Preparo das soluções-padrão dos DE

Foram preparadas sete soluções-estoque, uma para cada DE estudado (E1, E2, E3, EE2, BPA, 4NP, 4tOP), na concentração de 2 g/L em acetonitrila, devido à adequada solubilidade dos compostos nesse solvente. As soluções-padrão foram preparadas com três finalidades específicas: para definição do método cromatográfico e construção da curva de calibração; para utilização em ensaios ecotoxicológicos; e para dopagem das amostras de sedimentos utilizados no ensaio de biodisponibilidade entre compartimentos ambientais no Cenário 2.

Para as análises cromatográficas, foi preparado um mix dos compostos a partir das soluções-estoque previamente descritas. A concentração do mix foi de 20 mg/L de cada composto em acetonitrila. Este mix foi usado em cada uma das injeções de amostra em um vial separado no início e fim de cada rodada experimental, a fim de identificar cada composto no método cromatográfico utilizado. A curva de calibração foi construída com 9 pontos de concentrações preparadas a partir da solução-estoque, variando entre 20 ppb e 2 ppm.

Os ensaios ecotoxicológicos com a bactéria *Vibrio fischeri*, realizados no sistema Microtox, utilizaram soluções-estoque para preparar as soluções-teste de cada DE. A concentração inicial foi de 100 mg/L, com NaCl 2% (v/v) como diluente. A partir dessa concentração, foram preparadas diluições sucessivas em NaCl a 2% para construir a curva dose resposta e calcular a CE₅₀ de cada composto.

Para o preparo do mix destinado à dopagem dos sedimentos no Cenário 2 deste estudo, foram preparadas soluções intermediárias em metanol. As concentrações dessas soluções foram preparadas de acordo com a massa de sedimento usada em cada uma das três metodologias aplicadas, garantindo uma concentração aproximada de 400 mg de cada DE por Kg de sedimento.

3.3.4 Métodos de extração das amostras de sedimento para ensaio *in vitro* YES e análise cromatográfica

Conforme discutido no referencial teórico, a análise de sedimento apresenta desafios significativos, principalmente devido à presença de uma variedade de interferentes. O efeito matriz é particularmente evidente nos resultados obtidos dos ensaios químicos e biológicos, em

função da complexidade da composição desses sedimentos. Para minimizar esses efeitos, otimizar a detecção de DE nos sedimentos e avaliar seus impactos, foram selecionadas três metodologias de extração amplamente reportadas na literatura:

1. Método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*);
2. Extração assistida por ultrassom (*Ultrasound-assisted extraction - UAE*);
3. Extração com líquido pressurizado (*Accelerated Solvent Extraction - ASE*).

Para cada metodologia aplicada, foi realizada a análise de sedimentos dopados com uma solução de mix de padrões, conforme item 4.2.3. O comparativo entre as metodologias QuEChERS e UAE utilizou sedimentos coletados em Rio das Ostras (pontos de 6 a 10). Por sua vez, o comparativo entre as metodologias UAE e ASE foi realizado com sedimentos coletados em Ubatuba e Paraty (pontos 1 a 5). Os extratos obtidos a partir de cada método foram submetidos a diferentes análises, cujas etapas e diferenças estão apresentadas na Figura 10.

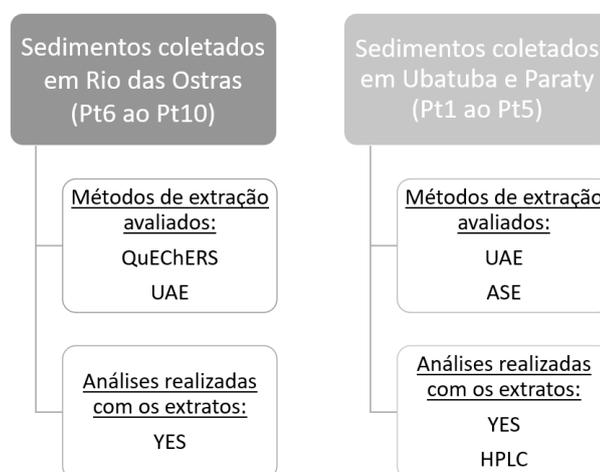


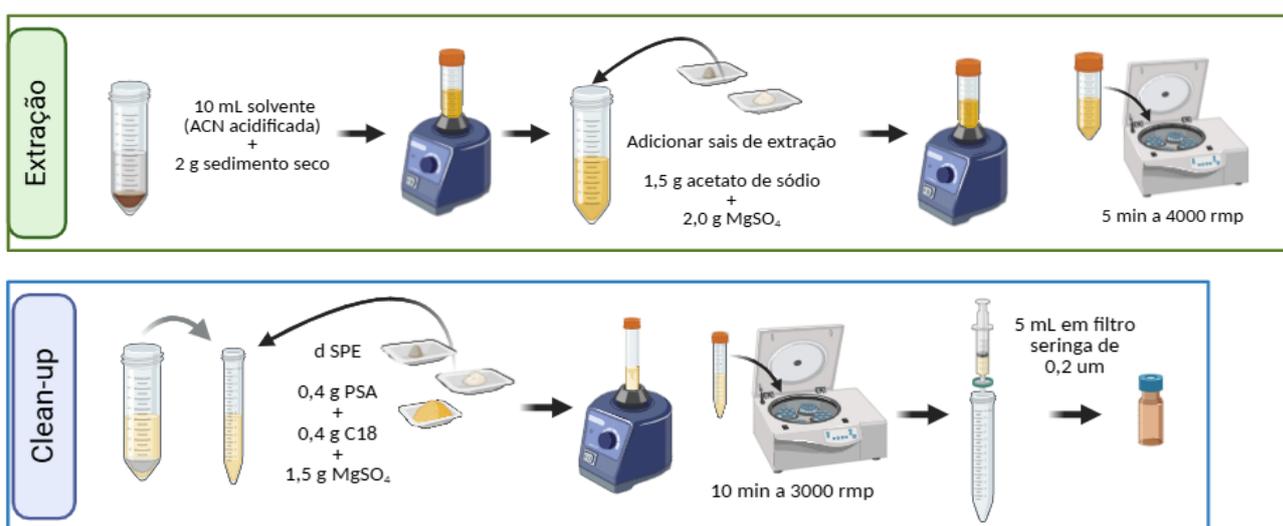
Figura 10: Comparação das metodologias de extração aplicadas aos sedimentos de cada ponto de coleta e os ensaios realizados com os respectivos extratos.

3.3.4.1 Procedimento experimental do Método QuEChERS

A metodologia utilizada nesta etapa foi adaptada de Berlioz-Barbier *et al.* 2014. Inicialmente, 2 g de sedimento seco foram submetidos à extração utilizando 10 mL de acetonitrila acidificada (1% de ácido acético em acetonitrila) e agitados em vórtex por um minuto.

Na etapa de partição (*salting-out*), foram adicionados 2,0 g de sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e 1,5 g de acetato de sódio anidro à mistura. Após nova agitada em vórtex por um minuto, a solução foi centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos.

Na etapa de *clean-up*, o sobrenadante obtido na centrifugação foi transferido para um novo tubo Falcon de 15 mL. Adsorvente foram adicionados à solução para remover interferentes. As quantidades utilizadas foram: 0,4g de PSA, 0,4 g de C18 e 1,5 g de MgSO₄. O tubo foi agitado em vórtex por um minuto para favorecer a adsorção, durante essa etapa dispersiva de extração em fase sólida (d-SPE), e depois centrifugado novamente por 10 minutos a 3000 rpm. Por fim, o sobrenadante da solução centrifugada foi filtrado através de um filtro seringa de 0,2 µm e transferido para um vial de análise. Todas as etapas desta metodologia estão ilustradas na Figura 11.



Fonte: Elaborado pela autora com Bio Render® (2024).

Figura 11: Etapas do processo de extração, partição e remoção de interferentes da metodologia de QuEChERS

3.3.4.2 Extração com solvente assistido por ultrassom (UAE)

O uso de sedimentos secos e liofilizados na análise de DE tem causado debates no meio acadêmico e científico, principalmente devido às potenciais interferências da matriz em ensaios químicos e biológicos. Antes de definir o método de secagem, é importante considerar parâmetros como constantes de ionização e dissociação, além dos pontos de ebulição e fusão dos compostos-alvo, a fim de evitar perdas durante o preparo das amostras.

O estudo de Valadares (2020) avaliou a secagem a 60°C para os estrogênios em sedimento, demonstrando maior eficiência em comparação à secagem a 100°C. A liofilização também foi aplicada em alguns sedimentos da área de estudo. Para a maioria das amostras do presente estudo, optou-se pela secagem parcial a 60°C, com exceção dos sedimentos de Rio das Ostras, nos quais a liofilização foi avaliada.

Uma quantidade de sedimento, parcialmente seca a 60 °C foi macerada e dividida em subamostras de 10 g, analisadas em duplicata. A extração foi realizada utilizando solvente em três ciclos, empregando banho ultrassônico de 10 min com 10 mL de metanol, seguido de centrifugação a 2500 g por 5 min. Os sobrenadantes de cada ciclo foram combinados em um balão volumétrico, e diluídos para 250 mL com água ultrapura, sendo a solução acidificada a pH 2. Os extratos obtidos foram submetidos a EFS, conforme descrito no item 4.1.6.

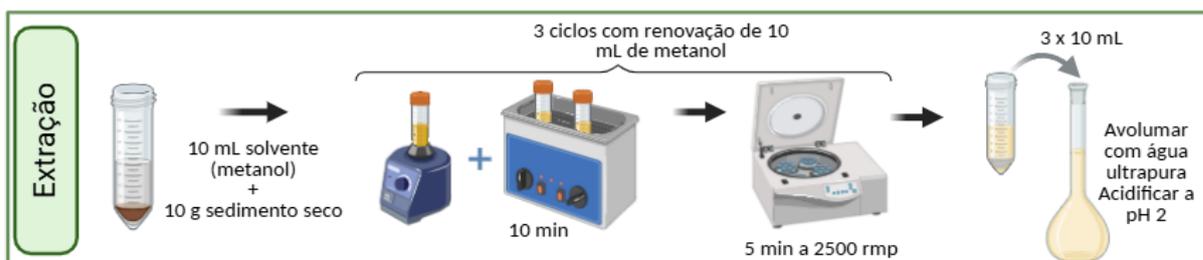


Figura 12: Etapas do método de extração assistida por ultrassom

Fonte: Elaborado pela autora com Bio Render® (2024).

3.3.4.3 Extração acelerada por solvente (ASE)

O método descrito por Marina (2016) foi adotado como referência para a aplicação deste procedimento, com adaptações nos parâmetros de extração para atender à realidade do laboratório e incluir todos os contaminantes investigados neste estudo. O equipamento utilizado foi o Dionex™ ASE™ 350 Accelerated Solvent Extractor, da Thermo Scientific.

A metodologia consistiu na inserção de um filtro de celulose no fundo da célula de ASE, seguido pela adição de 2 g de amostra de sedimento previamente homogeneizada com 1,5 g de terra diatomácea, utilizada como agente dispersante. O mix de padrões, previamente preparado conforme item 4.1.8 foi adicionado à amostra de sedimento em uma concentração de 50 ng g⁻¹ para contabilizar possíveis perdas durante o procedimento de extração.,

O diclorometano foi selecionado como solvente, utilizando três ciclos de extração estática de 10 min cada (tempo de purga = 60 s, volume de lavagem = 60%), a uma temperatura de 60 °C e pressão de 1500 psi. Os extratos gerados (30 mL) foram submetidos a uma etapa de limpeza (*clean up*) em coluna de sílica, seguidos de evaporação em TurboVap® e redissolvidos em 1000 µL de acetonitrila. Posteriormente, os extratos foram filtrados utilizando filtros de seringa de PTFE com tamanho de poro de 0,22 µm.



Figura 13: Etapas do método de extração acelerada por solvente com pressão

Fonte: Elaborado pela autora com Bio Render® (2024).

3.3.5 Preparo das amostras de água superficial para análises cromatográficas e ensaios *in vitro* YES

As amostras de água superficial analisadas por meio do bioensaio YES e de análises cromatográficas foram preparadas de acordo com Argolo et al. (2021). Primeiramente, 1L de amostra foi filtrada utilizando membranas (Millipore), com porosidades de 0,7 μm (GF) e 0,45 μm (MCE). As membranas de 0,7 μm contendo sólidos suspensos, foram submetidas à extração ultrassônica acelerada por solvente, que consistiu em 3 ciclos de 10 min em banho ultrassônico, utilizando 10 mL de metanol a cada ciclo. Os extratos obtidos da extração a partir das membranas foram diluídos para 250 mL com água ultrapura e acidificados a pH 2. Em seguida, as amostras filtradas e os extratos de membrana diluídos foram submetidos à EFS.

3.3.5.1 Extração em fase sólida (EFS)

A extração em fase sólida foi realizada com cartuchos Strata-X (Phenomenex®) de 500 mg de fase sorvente polimérica e 6 mL, sob vácuo em Manifold (Agilent Technologies®) e capela. O condicionamento foi procedido com 6 mL de hexano, 2 mL de acetona, 6 mL de metanol (grau HPLC, Tedia®) e 10 mL de água ultrapura com pH ajustado para 3,0, com HCl 3M (grau P.A., Merck). Em seguida, as amostras foram percoladas sob vácuo, na vazão aproximada de 3 mL min^{-1} com cuidado para que a fase não ficasse seca.

Após a percolação de amostras, foi realizado *clean up* com 10 mL de solução de metanol e água ultrapura (1:9) e, em sequência, o vácuo foi mantido por 10 minutos para completa secagem dos cartuchos. Os cartuchos foram embalados em papel alumínio e armazenados em freezer a -20 °C até o momento da eluição.

A eluição dos analitos foi realizada com 4 mL de acetona (grau HPLC, Tedia®), sob ação da gravidade, com os volumes transferidos para frascos de vidro de 10 mL usando o sistema manifold sem o vácuo. Ao final, o vácuo foi acionado por 5 minutos para a completa

secagem dos cartuchos. Os extratos das amostras foram separados em alíquotas iguais para o ensaio YES e para as análises cromatográficas. Posteriormente, foram evaporados com fluxo de nitrogênio gasoso e reconstituídos com 2 mL de etanol (grau HPLC, Tedia®) para a realização do ensaio YES e 1 mL de acetonitrila para a análise cromatográfica.

Para a EFS em amostras de sedimentos foi usado adicionalmente o cartucho Strata-SAX (Phenomenex®) de 500/6 mL para remoção de interferentes. Este foi condicionado separadamente do cartucho Strata-X, e foi procedido com 10 mL de metanol e 10 mL de água ultrapura, em seguida foi acoplado ao cartucho Strata-X para que a amostra passasse por ambos os cartuchos, sendo primeiro pelo Strata-SAX, para remoção dos interferentes e em seguida pelo Strata-X para a retenção dos analitos de interesse.

3.3.6 Caracterização das amostras por parâmetros físico-químicos

A caracterização físico-química das amostras de água superficial, água intersticial, elutriato e sedimento *in natura* foram conduzidas para identificar possíveis contaminações decorrentes do lançamento de efluentes nas regiões de estudo e avaliar o transporte de contaminantes entre os compartimentos ambientais analisados. Esses dados contribuem para um entendimento da dinâmica de adsorção e dessorção de compostos nos sedimentos.

Nas amostras aquosas, os parâmetros físico-químicos foram determinados conforme as metodologias descritas no APHA (2023), incluindo pH, condutividade, salinidade, cor, turbidez, DQO, TOC, Nitrito, Nitrato, UV 254 e nitrogênio amoniacal.

Para as amostras de sedimento as análises de pH, condutividade, salinidade, UV 254 e Na^+/K^+ , NH_4^+ seguiram metodologias descritas por Gastalho et al. (2009), que consiste no preparo de frações do sedimento em contato com solução de água ultrapura. O teor de matéria orgânica foi determinado pelo método gravimétrico com uso de mufla, segundo metodologia de Goldin (1987), enquanto o teor de umidade foi obtido pela diferença entre massa seca e úmida, com secagem a 105°C em estufa.

O carbono orgânico foi quantificado tanto nas amostras de sedimento quanto nas de água utilizando o equipamento Shimadzu TOC/SSM, OCT-1 modelo SSM 5000A. A análise granulométrica dos sedimentos foi realizada no Laboratório de Sedimentologia da Universidade Federal Fluminense, com o analisador de distribuição de tamanho de partículas, o CAMSIZER (Macrolab). As concentrações de sódio e potássio foram determinadas nas amostras de líquido intersticial dos sedimentos, utilizando o fotômetro de chama (910M - Analyser).

3.3.7 Análises cromatográficas

A técnica cromatográfica empregada foi HPLC/FLU-DAD, baseada na metodologia consolidada e validada por Moreira *et al.* (2021) no LES/UERJ. Nessa etapa, foram analisados os extratos de sedimentos de Rio das Ostras preparados com extração ultrassônica com solvente e com a metodologia do QuEChERS.

A detecção e quantificação dos estrogênios seguiram a metodologia descrita por Oliveira (2015), com adaptações de Silva (2016) e validação por Moreira (2021). Os compostos analisados foram os estrogênios 17 β -estradiol (E2), 17 α -etinilestradiol (EE2), estriol (E3) e os compostos fenólicos Bisfenol-A e 4-Nonilfenol, utilizando um cromatógrafo da Waters Corporation®, equipado com detector de fluorescência configurado para comprimentos de onda de emissão à 306 nm e excitação à 280 nm. A separação foi realizada com uma coluna cromatográfica Novapak PAH (4,6 x 250 mm, 5 micras), mantida a 30° C por um forno de colunas.

As condições de análise dos DE incluíram um fluxo de fase móvel de 1 mL/min no modo gradiente, variando a porcentagem de acetonitrila (ACN) e água ultrapura: 40% de ACN no início, 50 % aos 6 minutos, 30 % aos 9 minutos e 40% até o tempo total de 15 minutos. A fase móvel, composta por ACN e água ultrapura, era de alto grau de pureza, isenta de oxigênio e outros gases dissolvidos. O volume injetado foi de 20 μ L com três repetições por amostra. A temperatura do mostrador foi mantida a 18°C para prevenir degradações ao longo da análise. Antes da injeção, as amostras foram filtradas com auxílio de seringas de vidro e discos de membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com poros de 0,22 μ m (Millex®, modelo GV).

Devido a problemas operacionais, o equipamento HPLC/FLU-DAD precisou ser substituído para as análises das amostras de Ubatuba e Paraty. Foi utilizado um sistema cromatográfico composto pelo sistema Altus™ UPLC® e Empower® 3 (Waltham, MA) acoplado a um módulo de amostragem A-30, módulo de entrega de bomba de solvente A-30 e detector Altus SQ, com fonte de ionização ESI. A separação foi realizada com uma coluna Altus UPLC BEH C18 (150 mm x 2,1 mm, i.d., 1,7 μ m).

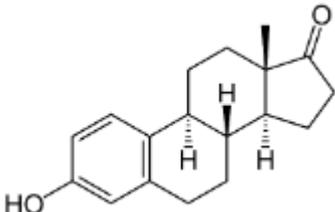
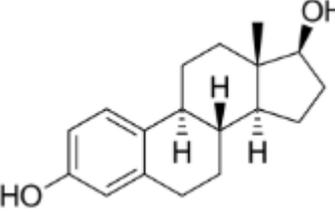
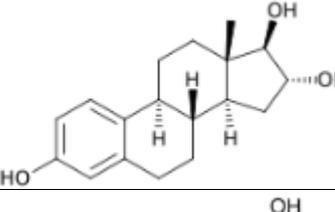
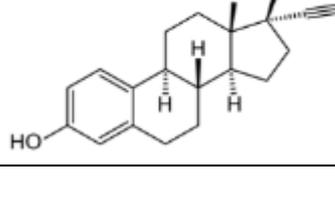
A fase móvel constitui em acetonitrila (fase A) e água ultrapura acidificada com 0,1% v/v de ácido fórmico) (fase B), com gradiente de eluição programada: 5,0% de A e 95,0% de B no início, aumento linear para 100,0% de A aos 8 min, mantido isocrático por 2 min, seguido de redução linearmente para 5,0% de B em 0,1 min e mantido por 0,9 min. O tempo total de separação foi de aproximadamente 11 min, com intervalo de 4 minutos entre injeções e

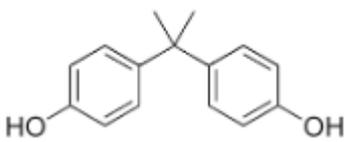
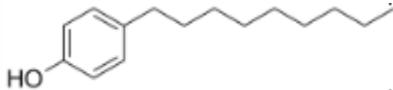
recondicionamento da coluna. A vazão foi de $0,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, a temperatura da coluna foi mantida a $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$, e o volume de injeção foi de $20,0 \mu\text{L}$ (amostra) e $2,0 \mu\text{L}$ (padrões).

O espectrômetro de massa em tandem (MS/MS) foi utilizado nos modos ESI negativo e positivo, com monitoramento de múltiplas reações (MRM) para determinar a melhor resposta dos estrogênios e compostos fenólicos. As condições ótimas foram ajustadas por injeções de amostras e padrão individuais. A fonte de íons MS foi mantida a $150,0 \text{ }^\circ\text{C}$, com voltagem do spray de íons de $3,5 \text{ V}$ e o potencial de entrada ajustado a 30 V . O nitrogênio (N_2) foi empregado como gás de colisão e dessolvatação, com temperatura de $450 \text{ }^\circ\text{C}$, fluxo de 800 L/h em na câmara e 40 L/h no cone.

Os padrões analisados incluíram Estrona (E1), Estradiol (E2), Estriol (E3), Etinilestradiol (EE2), Bisfenol A e 4-Nonilfenol, detalhados no Quadro 1, que apresenta suas nomenclaturas, estruturas moleculares, fórmulas, massas e características de detecção nos modos positivos e negativos.

Quadro 1: Informações sobre os compostos analisados neste estudo, incluindo nomenclatura, estrutura molecular, fórmula molecular, massa molecular e massa do íon atômico nos módulos positivo e negativo de eletrovoltagem.

Substância	Estrutura	Fórmula Molecular	Massa Molecular	Íon m/z modo positivo	Íon m/z modo negativo
Estrona – E1		$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_2$	270,4	271	269
Estradiol – E2		$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_2$	272,4	255 (273-18)	271
Estriol – E3		$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_3$	288,4	271 (289-18)	287
Etinilestradiol -EE2		$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_2$	296,4	279 (297-18)	295

Bisfenol A - BPA		$C_{15}H_{16}O_2$	228,29		227
4-Nonilfenol - 4NF		$C_{15}H_{24}O$	220,35		219

A partir dessas soluções estoques, foram preparadas diluições para obtenção da concentração de $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, adicionando-se $10 \mu\text{L}$ da solução estoque a $990 \mu\text{L}$ de metanol. Essas soluções foram injetadas no LC-EM em volumes de $2 \mu\text{L}$ por análise.

A análise foi realizada comparando duas condições de voltagens no cone do espectrofotômetro: voltagem tune (automática) e uma voltagem fixa de 15 eV , com objetivo de garantir a formação dos íons moleculares sem a perda de água.

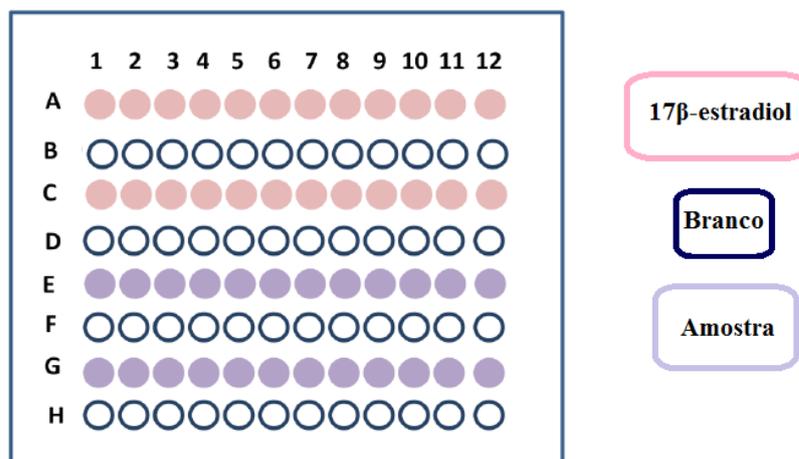
Os padrões foram reanalisados com voltagem determinada de 15 eV , pois foi percebido que os íons formados de forma predominante para o estradiol, estriol e etinilestradiol eram o íon molecular com a perda de 18 unidades de massa. Essa perda provavelmente era relativa à desidratação da hidroxila na posição 17 (DEWICK), o que é corroborado pela estrona que possui na mesma posição uma cetona, e conseqüentemente foi o único padrão a não apresentar a perda de água como comportamento.

Além da análise por electrospray, as amostras de Ubatuba e Paraty também foram analisadas por UPLC-DAD.

3.3.8 Ensaio *in vitro* YES

O ensaio *in vitro* YES foi realizado segundo a metodologia descrita por Routledge e Sumpter (1996), com modificações propostas por Gomes et al. (2023). Para o ensaio, foram utilizadas microplacas de 96 poços com fundo chato, onde cada fileira continha uma amostra em 12 concentrações de diluição seriada, o controle negativo e o controle positivo. As diluições foram preparadas em uma placa separada, conforme as seguintes etapas: (i) Adicionar $100 \mu\text{L}$ de etanol (grau HPLC) em todos os poços de uma fileira, exceto o primeiro poço; (ii) Adicionar $200 \mu\text{L}$ do extrato da amostra no primeiro poço; (iii) Transferir $100 \mu\text{L}$ do primeiro poço para o segundo e homogeneizar com a pipeta; (iv) Transferir $100 \mu\text{L}$ do segundo poço para o terceiro e homogeneizar; (v) Repetir o procedimento até o último poço, que deverá conter $200 \mu\text{L}$ ao final.

Após a diluição, uma alíquota de 10 μL do líquido de cada poço foram transferidos em duplicata para a placa de ensaio, onde o solvente foi evaporado dentro da capela de fluxo laminar. Esse procedimento foi repetido para todas as amostras e para o controle positivo. Para o controle negativo (branco) foram transferidos 10 μL de etanol (grau HPLC) para cada poço da fileira correspondente. As fileiras das amostras foram intercaladas com as do controle negativo para evitar contaminação cruzada, conforme ilustrado na Figura 3.



Fonte: GOMES (2020)

Figura 14: Esquema representativo da distribuição das amostras por fileiras em placas de 96 poços para realização do ensaio YES.

Uma curva padrão de referência nos ensaios foi preparada utilizando o 17 β -Estradiol como controle positivo. A diluição do controle positivo foi realizada de maneira idêntica às amostras. A solução estoque continha 17 β -Estradiol (> 98%, Sigma-Aldrich®) a uma concentração de 54,48 $\mu\text{g L}^{-1}$ em etanol (grau HPLC, Tedia®), gerando uma curva de 12 pontos na faixa de concentração de 2724 ng L^{-1} a 1,3301 ng L^{-1} .

Após a evaporação dos 10 μL transferidos para cada poço na placa de ensaio. Em seguida, 200 μL do meio de análise foram cuidadosamente adicionados em cada poço da placa, garantindo a ausência de contaminação. As placas foram então fechadas, lacradas, agitadas por 2 minutos em um agitador de placas (marca IKA, modelo MS-3) e incubadas a 30 °C por 72 horas.

Após o período de incubação, foi possível observar a mudança de coloração nos poços que apresentaram atividade estrogênica. Para finalizar o ensaio, foram lidas as absorbâncias nos comprimentos de onda 575 nm e 620 nm, para avaliar a cor e a turbidez, respectivamente, utilizando o espectrofotômetro leitor de microplacas VersaMax (Molecular Devices). Os valores de absorbância corrigidos foram obtidos segundo a Equação 1.

$$Abs_{corr} (amostra) = Abs_{575} (amostra) - (Abs_{620} (amostra) - Abs_{620} (controle\ negativo)) \quad Eq.1$$

Os dados de absorvância e concentrações corrigidas foram plotados, e as curvas sigmoidais resultantes foram ajustadas a uma função logística simétrica usando o pacote de software Origin 6.0 (OriginLab). Antes da quantificação da atividade estrogênica, foi realizada a análise do potencial citotóxico das amostras, comparando o crescimento celular em relação ao controle negativo. Em seguida, os resultados de equivalente-estradiol (Eq-E2) dos extratos foram obtidos em ng L⁻¹, pela interpolação entre a curva dose-resposta do padrão E2 e os dados das amostras, usando um modelo log-logístico, conforme a Equação 2.

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x_0/x)^p} + A_2 \quad Eq.2$$

Por fim, o Eq-E2 das amostras foi calculado em ng g⁻¹ para sedimentos e em ng L⁻¹ para água, considerando o fator de enriquecimento da amostra quando aplicável.

A citotoxicidade, ou seja, a inviabilização ou a inibição do crescimento das células de levedura ocasionadas pela amostra foi avaliada e quantificada através da absorvância a 620 nm, seguindo a Equação 3, conforme proposto por Frische et al. (2009).

$$Citotoxicidade = 1 - \left(\frac{Abs_{620} (amostra)}{Abs_{620} (controle\ negativo)} \right) \quad Eq.3$$

A atividade antiestrogênica foi avaliada seguindo a metodologia de determinação de atividade estrogênica com adição de estradiol em todos os poços contendo as 12 diluições em série da amostra na placa de ensaio, resultando na concentração final de 27,24 ng L⁻¹ de E2 em cada poço. A avaliação de atividade antiestrogênica permite a observação do efeito de desregulação em concentrações abaixo do limite de detecção, pois a resposta é observada a partir do decréscimo da resposta de absorvância corrigida do E2. Sendo assim, a resposta obtida nesta etapa é o efeito qualitativo desse potencial e identificação de possíveis compostos antagonistas.

3.3.9 Ensaio ecotoxicológicos

Os ensaios de toxicidade com o organismo-teste *Vibrio fischeri*, bactéria bioluminescente, foram realizados usando o sistema Microtox (SDI, analisador modelo 500), um fotômetro de precisão desenvolvido para esse bioensaio. A cepa bacteriana liofilizada foi adquirida da Umwelt br, e o ensaio seguiu a metodologia descrita na NBR 15411-3 (ABNT, 2021). As soluções de ensaio foram preparadas em laboratório com reagentes analíticos e água ultrapura. A solução de referência usada para construção da carta-controle foi o sulfato de Zinco

heptahidratado [3,14 mg. L⁻¹]. As amostras tiveram os parâmetros de salinidade, pH e condutividade medidos para o ensaio.

O elutriato dos sedimentos foi preparado segundo a metodologia descrita na ABNT NBR 15469 (ABNT, 2021) para ensaios ecotoxicológicos. Adotou-se a proporção de 1:4, misturando-se 3 g de sedimento seco com 12 mL de solução diluente de NaCl 3,5% (m/v). O líquido intersticial dos sedimentos foi extraído por processo mecânico de centrifugação, descrito no item 3.3.2. O sobrenadante do processo de centrifugação equivale ao líquido intersticial, o qual foi separado com auxílio de pipeta para posterior análise.

Inicialmente, a luminescência de 10 µL de bactérias puras foi registrada em cada cubeta. Em seguida, 900 µL da amostra foram adicionadas, as cubetas foram manualmente homogeneizadas e, então, incubadas a 15 °C por até 30 min, com leituras intermediárias nos tempos 5 minutos e 15 minutos. Um controle negativo (branco) foi preparado com uma solução de NaCl a 3,5%, e as amostras de elutriato e líquido intersticial foram analisadas em duplicata. Cada amostra foi diluída serialmente em solução de NaCl a 3,5%, sendo 900 µL de cada diluição adicionados a 10 µL da solução bacteriana diluída, em cubetas de borosilicato.

As soluções-padrão de DE também foram avaliadas segundo esta metodologia de ensaio a fim de calcular a concentração que causa efeito em 50% dos organismos-teste, para cada um dos compostos individualmente. Os resultados foram expressos em CE50 calculado pela reta de regressão linear obtida pelos valores logaritmos de gama e concentração das concentrações. As soluções-estoque foram preparadas em altas concentrações em acetonitrila, conforme descrito no item 3.3.1, para que fosse possível preparar uma solução-teste em diluente próprio para este ensaio. A proporção final de acetonitrila usada no ensaio não ultrapassou 0,1% e foi analisada como um controle adicional para assegurar que o uso deste solvente não afetasse os organismos-teste. A análise estatística *t-student* foi aplicada para a significância da diferença entre os controles, ACN e NaCl.

A resposta ao efeito tóxico foi medida após 30 min de exposição, observando-se a redução na emissão de luz, que indica o número de organismos que podem ser afetados pela toxicidade da amostra. Após o tempo de contato, a luminescência residual emitida pelas bactérias foi registrada, e esses valores foram processados estatisticamente no programa Microtox OMNI 4.1 para calcular a porcentagem de efeito em cada concentração-teste. A toxicidade de cada amostra foi comparada ao controle negativo (branco) para determinar se os resultados indicaram um efeito tóxico significativo. A resposta obtida para as amostras ambientais foi expressa em percentual de efeito, baseado no cálculo do fator de correção e dos valores de gama (Γ) obtidos no ensaio segundo as Equação 4 e Equação 5.

$$f_t = \frac{I_t}{I_0} \quad \text{Eq.4}$$

$$\Gamma_{(t,T)} = \frac{f_t \cdot I_0}{I_t} - 1 \quad \text{Eq.5}$$

O fator de correção (f_t) é calculado em cada um dos tempos de contato (5 minutos, 15 minutos e 30 minutos). O valor de I_t é obtido pela leitura do controle em cada tempo de exposição, sendo o I_0 do controle medido no tempo anterior à exposição.

3.4 Procedimentos dos ensaios para estudo do Cenário C2

3.4.1 Ensaio ecotoxicológico de biodisponibilidade

Nessa etapa do estudo, foram realizados experimentos de contato direto entre o sedimento e a água, seguidos pela extração de ambos os compartimentos e análise do potencial estrogênico e análises cromatográficas. Adicionalmente, foi conduzido o ensaio ecotoxicológico NBR 15308 (ABNT, 2023) com o organismo-teste *Mysidopsis juniae*, com adaptações propostas para avaliar a interface sedimento/água. Ao término do período de exposição, os compartimentos ambientais foram analisados quanto ao potencial estrogênico (ensaio YES) e por análise cromatografia.

Na primeira etapa, foi desenvolvido um ensaio em triplicata para avaliar o transporte de contaminação do sedimento para a água a partir da resposta do ensaio de atividade estrogênica (YES) para cada compartimento. Desta forma, foi avaliado o processo de recuperação do composto a partir do sedimento orgânico de Jabaquara (Pt 10) dopado com solução de E2 (220 ng. L⁻¹) em etanol. Para avaliar a perda do contaminante presente no sedimento em ambiente aquático, em um segundo recipiente foi avaliado o sedimento sem dopagem, apenas em contato com água ultrapura. E em um terceiro recipiente foi utilizada uma alíquota do sedimento não dopado e sem a interação com água. O experimento foi montado em bancada no laboratório com temperatura controlada (23 °C ± 2 °C) ao abrigo da luz. Após 24 horas de aclimatação, os sedimentos e sobrenadantes dos testes foram submetidos ao processo de extração UAE, descrito em 4.3.4.3, e os extratos foram analisados pelo ensaio YES e análises cromatográficas.

Na segunda etapa da avaliação da biodisponibilidade dos compostos, foi desenvolvido um ensaio ecotoxicológico para identificar os efeitos de exposição indireta aos DE com organismos-teste padronizados. O procedimento envolveu o uso do sedimento coletado em Jabaquara - Paraty (Pt10) intencionalmente contaminado com mix de DE.

O experimento foi conduzido utilizando três concentrações do mix de padrão, denominadas C1 (3,57 ppm de cada DE), C2 (7,14 ppm de cada DE) e C3 (14,28 ppm de cada

DE). Os ensaios tiveram como objetivo avaliar a migração dos contaminantes entre os compartimentos água e sedimento. Para isso, foram simulados dois tipos de exposição: direta e indireta.

Na exposição direta, organismos-teste de coluna d'água foram colocados em recipientes que simulavam um ambiente aquático, contendo sedimentos naturais em contato com o sobrenadante, preparados com as concentrações descritas anteriormente. Na exposição indireta, os mesmos organismos-testes foram colocados em recipientes simulando um ambiente aquático com os sedimentos previamente dopados nas concentrações mencionadas, em contato com o sobrenadante composto por água de cultivo natural, simulando despejo de poluentes diretamente no sedimento.

Para estas simulações, foram selecionados os organismos epibentônicos *Mysidopsis juniae*. Os ensaios consideraram a hipótese inicial de que há migração de DE entre os compartimentos de um ambiente aquático. Simulando um cenário com lançamento direto de efluentes ricos em DE em um determinado compartimento ambiental, água ou sedimento, e sua biodisponibilidade quando em contato com o outro compartimento isento do lançamento de DE. Com isto, objetivaram avaliar o efeito provocado pelo sinergismo e biodisponibilização destes contaminantes para organismos modelos em vias diretas e indiretas de exposição, partindo da premissa de migração de contaminantes entre matrizes.

Paralelamente aos ensaios de biodisponibilidade proposto com alterações metodológicas, foi realizado um ensaio com o mesmo organismo-teste de acordo com a normativa da ABNT NBR 15308 (ABNT, 2023), utilizando a mesma solução de mix de padrões de DE. Neste ensaio, os organismos foram expostos apenas a fração aquosa, simulando ambientes controlados em laboratório para os ensaios convencionais. As concentrações analisadas foram aquelas correspondentes a cada DE incluído no estudo (E1, E2, E3, EE2, 4tOP, 4NP e BPA). O objetivo foi elucidar o transporte dos DE entre os diferentes compartimentos ambientais e os efeitos nos organismos-teste selecionados.

Os três ensaios ecotoxicológicos com *Mysidopsis juniae* foram realizados utilizando 100 g de sedimento e 300 mL de água de cultivo. Como a solução de mix de padrões foi preparada em metanol, foi necessário inserir um controle positivo, além do controle negativo, para avaliar o efeito nos organismos da mistura de metanol e água do mar (1% v/v). Durante os experimentos, os parâmetros físico-químicos de pH, oxigênio dissolvido (OD), condutividade, salinidade e temperatura foram monitoradas no início e no fim do ensaio. Os recipientes contendo simultaneamente sedimento e água foram mantidos sob leve aeração para evitar a depleção de oxigênio no período de 96 horas. Em cada recipiente, foram adicionados 10

organismos com 4 a 5 dias de vida, retirados de matriz consolidada com carta-controle em DSS (10 ppm). O resultado do ensaio foi expresso em percentual de efeito para cada concentração avaliada, com o objetivo de avaliar a aplicabilidade dos ensaios tradicionais de ecotoxicologia para monitorar potenciais efeitos de DE em ambientes aquáticos estuarinos.

3.4.2 Análises cromatográficas e ensaio YES para avaliação da biodisponibilidade

Para quantificação dos DE, foi realizada a análise cromatográfica em ensaios de contato com sedimentos dopados de diferentes granulometrias e composições, em contato com água ultrapura. Após a mistura, o sedimento e o sobrenadante foram separados e analisados como amostras ambientais para a quantificação do potencial estrogênico e identificação dos compostos.

O sedimento foi submetido ao procedimento de extração por UAE, descrito no item 3.3.4.2, seguido pela quantificação dos DE por HPLC/FLU-DAD, conforme a metodologia descrita em 3.3.7, e pelo ensaio *YES* (descrito no item 3.3.8). O objetivo desta etapa foi avaliar a possível transferência e degradação dos compostos e, por meio da potência relativa de cada DE, estabelecer uma correlação entre as respostas observadas nas diferentes matrizes (água, sedimento e material particulado).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização físico-química das amostras e subamostras de água superficial e sedimento das áreas de estudo - Cenário 1

Os dados de precipitação (pluviométricos) são fundamentais para a caracterização de uma área de estudo, devido à capacidade das chuvas de atuar na lixiviação dos contaminantes para os corpos hídricos e serem depositados nos estuários. Durante eventos de precipitação intensa, partículas e compostos presentes no solo e na pavimentação urbana podem ser carregados para os corpos d'água por escoamento superficial, aumentando a turbidez da água e as concentrações de compostos dissolvidos. Esse processo também contribui para o carreamento de sais, elevando os valores de condutividade, salinidade e sólidos totais dissolvidos, o que evidencia fontes difusas de poluição proveniente de áreas rurais e urbanas. Por outro lado, o aumento do fluxo de água nos corpos hídricos pode promover a diluição dos DE, ao mesmo tempo que favorece o transporte desses contaminantes para o ambiente marinho.

Para fomentar as discussões sobre os parâmetros físico-químicos analisados nas amostras, foram utilizados dados de série histórica (1991-2022) de precipitação para as três regiões, gerados pelos modelos ECMWF Data Center (European Centre for Medium-Range Weather Forecasts) e disponibilizados pelo Climate Data, conforme Figura 15.



(a)

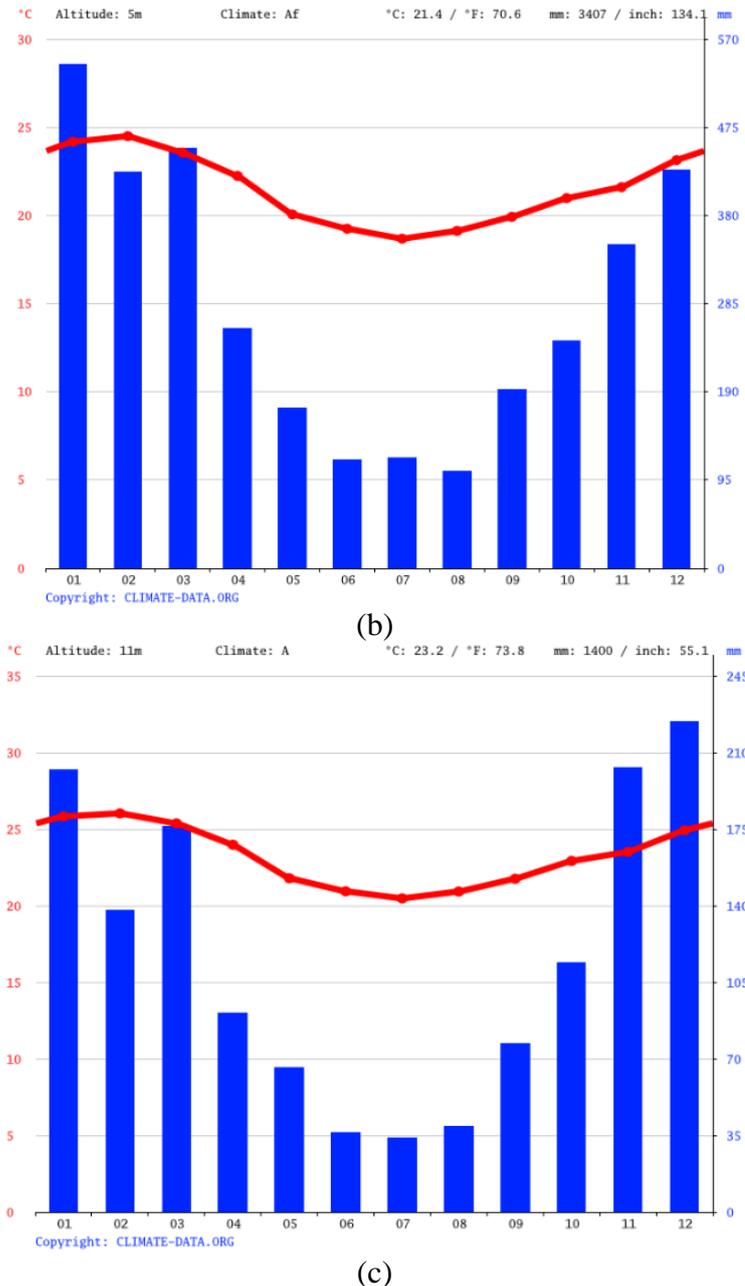


Figura 15: Gráficos da série histórica (1991-2022) de precipitação mensal das áreas de estudo (a) Ubatuba; (b) Paraty; (c) Rio das Ostras, gerados pelos modelos ECMWF Data Center (European Centre for Medium-Range Weather Forecasts) e disponibilizados pelo Climate Data.

As coletas em Ubatuba e Paraty foram realizadas no mês de outubro, o qual representa o período chuvoso para ambas as localidades, segundo exposto na Figura 15. No entanto, em Ubatuba, tanto o volume do acumulado de chuvas quanto a periodicidade das chuvas no mês são mais intensos, com uma média histórica de 16 dias de chuva no mês. As coletas em Rio das Ostras ocorreram em março, que também é considerado um mês de grandes precipitações para a região, sendo o quarto mês com maior índice de chuvas. Sendo assim, os resultados apresentados para os parâmetros a seguir expressam o período chuvoso de todas as regiões analisadas.

Os parâmetros físico-químicos, incluindo pH, carbono orgânico total, salinidade, condutividade, carbono orgânico total, nitrito, nitrato, cor e turbidez do elutriato das amostras de sedimentos coletados nas áreas estudadas foram apresentados na Tabela 2. A análise desses parâmetros permitiu avaliar a influência de fatores ambientais e antrópicos na qualidade das águas superficiais e dos sedimentos das áreas de estudo.

Tabela 2: Resultados dos parâmetros físico-químicos obtidos para as subamostras de elutriato dos sedimentos coletados em cada ponto das áreas de estudo.

Município	Local da coleta	PT	Água Elutriato										
			UV 254 (abs)	DQO (mgO ₂ .L ⁻¹)	Nitrito (mg.L ⁻¹)	Nitrato (mg.L ⁻¹)	pH	Condutividade (uS/cm ²)	Cor Verdadeira (UC)	Cor Aparente (UC)	Turbidez (UNT)	Salinidade	
Ubatuba	Indaiá	1	2,129	10,71	<LQ	<LQ	6,9	91,6	11	28	1,04	3	
	Grande	2	0,507	2,74	0,033	<LQ	7,11	69,8	212	216	31	6	
	Tavares	3	0,094	0,48	0,057	<LQ	7,32	79,1	224	159	15,6	3	
	Acaraú	4	2,029	26,03	0,071	0,183	6,87	128,2	214	193	31	2	
Paraty	Jabaquara	5	0,133	46,27	0,508	0,437	7,71	374,1	142	140	19	15	
Rio das Ostras	Mangue I	6	1,851	13,93	0,083	<LQ	7,09	52,2	349	357	51	17	
Ostras	Mangue E	7	1,429	10,95	0,078	<LQ	6,98	57	347	350	53	18	
	Estuário Água	8	2,102	13,21	0,073	<LQ	6,96	45,8	350	358	54	15	
	Estuário Seco	9	2,516	16,75	0,17	<LQ	6,61	111,4	221	294	35	15	
	rio das Ostras	10	3,112	26,87	0,291	0,071	7,42	374,2	149	212	28	16	

O uso de elutriato é comum para uma simulação simplificada de ressuspensão do leito sedimentar, carreando substâncias para a fase aquosa. O uso de água ultrapura no processo de elutriação corresponde à fração solúvel dos componentes orgânicos e inorgânicos do sedimento em água. O elutriato simula as condições das operações de dragagens e, bioensaios de toxicidade com essa fração são utilizados na avaliação dos efeitos tóxicos potenciais do material dragado.

A análise do líquido intersticial não foi realizada uniformemente nas áreas de estudo. Em Rio das Ostras, a quantidade limitada de massa sedimentar coletada comprometeu a execução desta etapa, devido à etapa de liofilização empregada como método de preparo para a extração. Por conta dessa limitação, as amostras dos pontos de coleta dessa região não foram submetidas aos processos mecânicos para a retirada de líquido intersticial. Portanto, os parâmetros físico-químicos dos líquidos intersticiais foram avaliados apenas nas amostras de Ubatuba e Paraty. Os parâmetros analisados foram pH, condutividade, salinidade, DQO, teor de Na⁺/K⁺ e espectrometria UV 254 µm, os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Resultados dos parâmetros físico-químicos obtidos para as subamostras de líquido intersticial dos sedimentos coletados em Ubatuba e Paraty.

Município	Local da coleta	PT	Água Intersticial						
			UV 254 (abs)	DQO (mgO ₂ .L ⁻¹)	Na ⁺ (ppm)	K ⁺ (ppm)	pH	Condutividade (mS/cm ²)	Salinidade
Ubatuba	Indaiá	1	0,157	15,74	18,8	0,8	8,01	13,32	10
	Grande	2	<0	16,24	21,2	7	8,06	16,18	14
	Tavares	3	<0	4,93	19,1	5,1	7,88	12,1	10
	Acaraú	4	0,026	19,78	30	1	8,39	7,61	8
Paraty	Jabaquara	5	0,144	22,61	46	23,6	7,79	25,1	19

O líquido intersticial analisado refere-se à camada superficial do sedimento, ou seja, à camada biologicamente ativa. Conhecer o pH da água intersticial é importante, pois valores extremos de pH prejudicam a biota, podendo causar desequilíbrio ecológico. Além disso, variações no pH podem alterar a partição dos contaminantes entre as fases particuladas e líquidas, aumentando a mobilidade desses compostos para a coluna d'água. A mobilidade dos contaminantes também é afetada pela presença de íons, neste trabalho foram avaliados o sódio e o potássio (CAVALCANTE, 2020). Além disso as concentrações desses macronutrientes estão relacionadas ao nível de poluição por fontes antropogênicas que esses ambientes estão submetidos (MOTA *et al.*, 2024)

É relevante comparar os valores de pH no elutriato e no interstício, uma vez que, geralmente, o pH tende a ser menor no líquido intersticial em relação à interface sedimento-água devido à mineralização microbiana da matéria orgânica, principalmente nas camadas superficiais dos sedimentos, cujo processo libera íons H₃O⁺ e CO₂ (LESVEN *et al.*, 2010). No entanto, isto não foi observado para o estudo. Os pontos de elutriato analisados apresentaram pH alcalino variando entre 7,79 e 8,39, valores considerados adequados para ambientes salinos. Enquanto os valores para o líquido intersticial estavam próximos à neutralidade, na faixa entre 6,64 e 7,61.

A caracterização físico-química das águas superficiais foi conduzida nos pontos de 1 a 5 e nos pontos 8 e 9. Entretanto, em Rio das Ostras, a coleta de amostras nos pontos 6, 7 e 10 não foi viabilizada devido às condições de maré baixa, que resultaram na seca total do estuário e das áreas de mangue adjacentes. Nessa localidade, os pontos de coleta acessíveis restringiram-se a acúmulos isolados de água no estuário (Pt9) e em áreas próximas ao leito do rio (Pt8). Os resultados obtidos dos parâmetros físico-químicos de carbono orgânico total, DQO, pH, condutividade, salinidade e espectrometria UV 254 μm das águas superficiais estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados dos parâmetros físico-químicos obtidos para as amostras de água superficial coletadas em cada área de estudo.

Município	Local da coleta	PT	Água Superficial					
			UV 254 (abs)	DQO (mgO ₂ .L ⁻¹)	pH	Condutividade (mS.cm ⁻²)	Salinidade	COT (mg/L ⁻¹)
Ubatuba	Indaiá	1	<0	20	7,56	73,3	25	6,302
	Grande	2	0,7481	24,28	7,82	75,4	22	9,143
	Tavares	3	0,026	8,81	7,47	1,293	30	5,95
	Acaraú	4	0,157	31,19	6,57	0,911	26	17,15
Paraty	Jabaquara	5	0,144	78,57	7,35	124,61	34	25,73
Rio das	Estuário Água	8	0,982	14,85	8,16	318,39	35	5,71
Ostras	Estuário Seco	9	1,964	17,34	8,01	333,74	35	6,18

A salinidade observada nas águas superficiais em todos os estuários do estudo indica um aporte maior de água marinha (salinidade ≈ 30) do que das águas fluviais. A contribuição oceânica favorece a bioturbação de fundo, com a ressuspensão de partículas finas do sedimento para a coluna d'água e deposição de partículas mais grosseiras (SAVERGNINI, 2013). Sendo assim, são formados complexos de sedimento finos com matéria orgânica sedimentar e se tornam biodisponíveis para organismos aquáticos. A matéria orgânica sedimentar pode ser considerada um dos mais importantes e completos testemunhos de mudanças ambientais, em escala local e global (SAVERGNINI, 2013).

Para contribuir com a análise de contaminação destes pontos foi utilizado a leitura de absorvância UV 254 nm, parâmetro que também é usado como correlação para avaliar a presença de compostos aromáticos na água. A leitura deste parâmetro vem sendo estudada como uma ferramenta de otimização dos ensaios que demandam uma complexidade maior na execução. É utilizada para identificar substâncias orgânicas, como por exemplo, as substâncias húmicas, os contaminantes orgânicos emergentes (ANUMOL et al., 2015; SGROI et al., 2018) e o carbono orgânico dissolvido, principalmente na indústria petrolífera, que demanda uma velocidade muito elevada na obtenção de resultados. Ademais, os valores de DQO também são associados ao lançamento de efluentes domésticos, caracterizados por uma alta concentração de matéria orgânica. Para os estuários avaliados, os valores de DQO e COT reforçam a influência de fontes poluidoras urbanas nas áreas de estudo.

De acordo com a Resolução CONAMA n° 357, de 17 de março de 2005 (BRASIL, 2005), que estabelece diretrizes para classificação dos corpos hídricos, águas com salinidade entre 0,5 e 30 são classificadas como salobras, enquanto valores iguais ou superiores a 30 são classificadas como salinas. Na data de coleta, os pontos 1, 2 e 4 apresentaram características mais salobras, indicando maior influência do carreamento de águas do rio no estuário. Quando

o estuário tem maior influência oceânica, sua capacidade de autodepuração dos contaminantes aumenta, promovendo também uma maior diluição dos contaminantes, reduzindo o impacto dos despejos na biota local (BARROSO e MOLISSANI, 2019). Em contrapartida, os pontos 3, 5, 8 e 9 tiveram salinidades próximas ou superiores a 30, evidenciando a influência oceânica para este ambiente.

Considerando ainda a Resolução CONAMA 357/2005 (Brasil, 2005) para avaliação, os corpos hídricos são classificados segundo seu uso e em relação aos limites dos parâmetros físico-químicos monitorados. Para águas salobras, o limite de COT é de até 10 mg/L, com pH entre 5 e 9 para águas de classe 3. Em águas de classe 2, o limite é de até 5 mg/L de COT, com pH entre 6,5 e 8,5 e ausência de efeito ecotoxicológico agudo sobre os organismos, conforme critérios do órgão ambiental competente ou, na ausência deste, de instituições nacionais ou internacionais renomadas, comprovado por ensaios ecotoxicológicos padronizados ou outros métodos cientificamente reconhecidos. A classe 2 inclui águas destinadas à pesca amadora e recreação de contato secundário, enquanto a classe 3 abrange águas destinadas à navegação e harmonia paisagística.

Os pontos de amostragens 6 a 10, estão em uma região de forte interesse turístico com seu uso associado à recreação de contato primário, localiza-se em uma área de mangue protegido que desemboca na praia da Boca da Barra, o que indica que a qualidade da água deveria se enquadrar na classe I (Brasil, 2005). No entanto, a intensa atividade antrópica e a presença de grande quantidade de embarcações na região e prática de *Jet Ski* contribuem para a deterioração da qualidade desse corpo hídrico. Parte desse efeito é atribuído ao crescimento populacional sofrido pelo município, levando ao aumento da geração de esgoto sem políticas públicas adequadas de saneamento para acompanhar o desenvolvimento local (BARROSO e MOLISSANI, 2019). Ademais, este estuário já foi avaliado por outros autores quanto ao seu grau de poluição em sedimentos em toda a bacia de drenagem, constatando presença de fontes poluidoras de esgoto em toda sua extensão e derivados de petróleo na parte fluvial (SAVERGNINI, 2013; RANGEL, 2010). Por tanto, a classificação deste manancial segundo a resolução CONAMA 357/2005 não está de acordo com o uso efetivo destas águas pela população, contribuindo para riscos à saúde da população e à biota.

Os pontos de amostragem 1 a 5 correspondem a diferentes estuários com composições e usos distintos, sendo cada um deles descrito a seguir. A qualidade das águas dos rios de Ubatuba é monitorada por programas realizados em parcerias de ONGs e instituições público-privadas, com financiamento da FEHIDRO. Um exemplo são os projetos da Associação

Socioambientalista Somos Ubatuba (ASSU-Ubatuba), que se dedica à gestão das águas dos rios Grande, Indaiá e Acaraú.

O rio Acaraú (Pt 4) é considerado um dos rios com pior qualidade de águas na região, conforme dados de monitoramento de Índice de Qualidade da Água (IQA) apresentado pela CETESB (2015) e pelo Instituto Costa Brasilis (ICB). Este rio sofre diversos impactos ambientais decorrentes da ação antrópica, uma vez que percorre diversos bairros do município, alguns dos quais com ocupação irregular nas proximidades de suas margens. Parte da população ao redor do rio não é atendida por sistema de esgotamento sanitário, resultando no despejo ilegal de esgoto não tratado. Por sua vez, a vazão do rio é ineficiente para a autodepuração dos poluentes, o que compromete a balneabilidade da praia de Itaguá, localizada em sua foz. Esse impacto afeta negativamente o turismo da região e gera um déficit econômico local.

O ecossistema aquático também sofre impacto devido às ações antrópicas, como alterações hidrológicas, contaminação, enriquecimento com nutrientes, retirada da vegetação ripária, assoreamento e alteração biológica, afetando a sobrevivência, o crescimento e a reprodução dos organismos locais (HAMADA et al., 2014). De acordo com o estudo elaborado por dos Santos e Batalla (2017), a biodiversidade local próxima à foz do rio Acaraú encontra-se alterada, com perda significativa de espécies bentônicas, relacionada aos altos índices de surfactantes no corpo hídrico decorrente da contaminação por esgoto. Essa condição é classificada como azóica, o que significa ausência de fauna na amostragem, sendo definida como uma zona de águas fortemente contaminadas, conforme o Índice de *Biological Monitoring Work Party* (BMWP) da CETESB (2012).

Um dos pontos de monitoramento adotados pelo Instituto Costa Brasilis no projeto coincide com o ponto do rio Acaraú adotado no presente trabalho. Os dados apresentados pelo ICB indicam uma qualidade predominantemente ruim do IQA associados a períodos mais secos, com variações para aceitável em períodos de chuva. Sendo assim, os dados aqui apresentados se enquadram no período em que a qualidade deste ambiente está em seu melhor desempenho. Os dados do ICB também retratam que há uma oscilação entre a classificação do ambiente como doce e salobra, devido às influências sazonais de dinâmica de correntes e marés no estuário. Esta caracterização confirma os valores obtidos neste trabalho, no entanto, o monitoramento feito pelo ICB não se estende à análise de ecotoxicidade e nem quanto à presença de contaminantes de preocupação emergente.

A bacia do rio Grande (Pt 2) possui vasta extensão e é coberta por florestas nativas com áreas de preservação (floresta ombrófila densa no domínio da Mata Atlântica). O rio Grande é o principal manancial de abastecimento de Ubatuba, atendendo cerca de 88% da população, por

meio da Estação de Tratamento de Água (ETA) Carolina. De acordo com o Código Florestal, suas margens devem ser protegidas por uma Área de Preservação Permanente (APP) de 50 metros. No entanto, diversos trechos do rio apresentam ocupações irregulares que afetam a qualidade ambiental e colocam a bacia hidrográfica em situação crítica, em relação ao desmatamento, saneamento inadequado e despejo irregular de resíduos das embarcações no porto local (GASPAR, 2014). Parte dessa população ilegal não possui coleta de resíduos, utiliza fossas sépticas ou despejo de esgoto diretamente no rio, e não há um sistema adequado de drenagem de águas pluviais (BUCHIANERI, 2004; LEAL, 2014). Aparte final desta bacia é composta pelo estuário que apresenta atividade pesqueira e embarcações, sendo ainda encontrada uma área com acondicionamento irregular de resíduos sólidos nas proximidades da margem.

O ponto de coleta 1 encontra-se na Bacia hidrográfica do rio Indaiá, apresenta uma das maiores densidades populacionais de Ubatuba, com grande ocupação urbana consolidada nas proximidades da orla, onde vivem famílias caiçaras. A parte montante do rio é protegida por vastas áreas de unidades de conservação e manutenção da Mata Atlântica (IBGE, 2010). Devido à sua geografia e aspectos geoespaciais da região, essa área é classificada como forte susceptibilidade a deslizamentos, erosão costeira e inundação. Isso destaca a importância da preservação ambiental, não apenas para a manutenção ecológica/ecossistêmica, mas também para a saúde e segurança da população local (OLIVATO et al., 2017). Embora a área tenha vastas zonas de preservação, os impactos antrópicos ainda precisam ser monitorados constantemente para assegurar a sobrevivência da biodiversidade local. Abessa e Burone (2003) avaliaram a caracterização físico-química e ecotoxicológica dos sedimentos desta e de outras regiões de São Paulo e encontraram baixos teores de nitrogênio amoniacal, carbono, fósforo e enxofre no rio Indaiá, sendo que os sedimentos não apresentaram ecotoxicidade quando expostos aos copépodos usados como organismo-teste (*S. knabeni*), concluindo assim que o ambiente apresenta baixo impacto antropogênico.

O rio Tavares (Pt 3) corta a região central de Ubatuba, apresentando pequenos fragmentos de mangue em suas margens e uma ocupação urbana consolidada. Até 2004, uma estação de tratamento de esgoto contribuía para a melhoria da qualidade ambiental do corpo hídrico, no entanto a desativação dessa estação resultou em um aumento da poluição (ALVES, 2018; VASCONCELLOS e SANCHES, 2009). O estudo de Assunção et al. (2017) avaliou a qualidade dos sedimentos de áreas de manguezal no Sudeste do Brasil e identificou uma contaminação fraca a moderada por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) nos sedimentos do rio Tavares, além de níveis considerados normais de n-alcanos nesta região.

Os parâmetros físico-químicos analisados para o sedimento *in natura* foram o teor de umidade, teor de matéria orgânica, carbono orgânico total e granulometria e estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Resultados dos parâmetros físico-químicos obtidos para as amostras de sedimentos *in natura* coletados em cada área de estudo.

Município	Local da coleta	PT	Sedimento <i>in natura</i>				
			Teor de umidade (%)	COT (mg/g)	Matéria orgânica (%)	pH	Granulometria
Ubatuba	Indaiá	1	24,6	2,39	1,8	7,82	areia fina/média
	Grande	2	38,28	11,2	4,8	7,47	areia média
	Tavares	3	19,2	0,15	0,8	7,56	areia média
	Acaraú	4	35,8	9,07	4	6,57	areia muito fina
Paraty	Jabaquara	5	73,9	24,82	11,8	7,35	lama
Rio das Ostras	Mangue I	6	24,32	3,91	2,7	5,94	areia fina
	Mangue E	7	24,09	3,79	2,7	5,5	areia fina
	Estuário Água	8	24,23	1,94	1,1	4,6	areia fina/média
	Estuário Seco	9	26,9	3,06	2,1	5,12	areia fina/média
	rio das Ostras	10	25,63	4,17	2,9	5,69	areia fina/média

Os sedimentos de Rio das Ostras apresentaram resultados similares na sua caracterização, variando a granulometria da área, como o diâmetro dos grãos classificados como areia fina nos pontos 6 e 7. A região apresentou um pH com tendência ácida. Já os dados dos estuários de Ubatuba, apresentaram grande variação quanto aos constituintes do sedimento. O sedimento de Paraty foi a fração com a maior característica orgânica, com grãos de sedimento muito finos, sendo classificados como lamosos.

Os sedimentos dos pontos 2, 4, 5 e 10 analisados neste trabalho, apresentaram elevadas concentrações de matéria orgânica nos parâmetros analisados, o que sugere um maior favorecimento da adsorção de DE nos mesmos. Dentre estes, apenas o ponto 10 pertence ao estuário de Rio das Ostras. Outros estudos avaliaram a qualidade e transporte de sedimentos para esta região e obtiveram resultados semelhantes na avaliação da presença de compostos orgânicos para o estuário de Rio das Ostras (RANGEL, 2011), pontuando que o transporte de sedimento desta região é mais favorecido com partículas mais finas no verão, e partículas mais grossas no inverno (FERNANDES e CASTRO, 2020). Este fenômeno é correlacionado com os ventos, correntes e zonas de convergência que favorecem o transporte de partículas mais finas. Desta forma, as coletas foram realizadas no verão, indicando o cenário onde tem a menor granulometria.

4.2 Resultados dos ensaios ecotoxicológicos das amostras de sedimento e subamostras das áreas de estudo - Cenário 1

Os ensaios ecotoxicológicos foram realizados conforme as normativas vigentes para o organismo-teste *Vibrio fischeri* (ABNT, 15411-3). O objetivo principal foi avaliar a disponibilidade de contaminantes provenientes do sedimento ressuspensionado na fração aquosa das subamostras de elutriato, utilizando a inibição de bioluminescência bacteriana como indicador. Vale destacar que esse ensaio não possui mecanismos específicos para detectar efeitos relacionados à desregulação endócrina. Assim, as respostas obtidas refletem um cenário pontual e momentâneo, considerando a toxicidade da amostra como um todo.

Nesse ensaio, as subamostras de elutriato dos sedimentos de Rio das Ostras foram analisadas nos períodos de exposição de 5, 15 e 30 minutos. Os percentuais de inibição da bioluminescência observados para cada amostra estão apresentados na Figura 16. Ressalta-se que a água intersticial dos sedimentos de Rio das Ostras não foi obtida, o que impossibilitou a avaliação do potencial ecotoxicológico dessa fração.

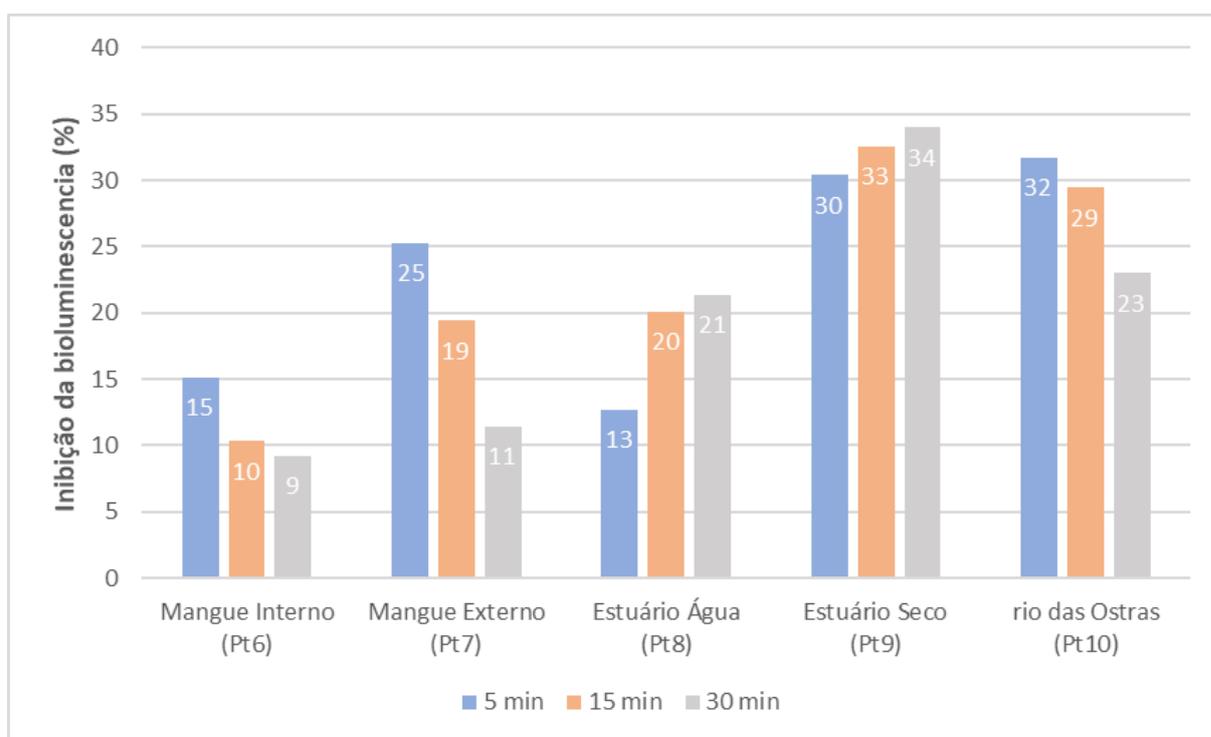


Figura 16: Resultados de % de inibição da bioluminescência obtidos nos ensaios de ecotoxicidade do elutriato de sedimentos de Rio das Ostras com o organismo-teste *Vibrio fischeri*.

As amostras de elutriato de Rio das Ostras não apresentaram efeito tóxico significativo, com o maior efeito de inibição de bioluminescência observado sendo de 34 % com 30 minutos

de exposição, para a amostra coletada no ponto 9. Esta área corresponde a fração do estuário que, em marés baixas, fica com a totalidade da camada sedimentar exposta. O sedimento deste ponto apresentou características mais ácidas, com pH de 5,12, e sedimentos de grãos médios a finos, com teor de umidade de 26,9%, COT de 3,06 mg. g⁻¹ e composição de 2,1% de matéria orgânica nos grãos. O pH é um fator limitante para o ensaio com *V. fischeri*, sendo a faixa ideal de trabalho entre 6,5 a 8. No entanto, o procedimento de elutriação deste sedimento resultou em um aumento no valor de pH, adequando-o dentro da faixa de trabalho do organismo-teste. A medição de nitrito (0,17 mg. L⁻¹) e valor de absorbância UV 254 nm (2,516 abs) mais elevados nesse ponto podem ter contribuído para o leve aumento na inibição da bioluminescência (PAVLOVSKY *et al.*, 2024; YARGEAU *et al.*, 2023).

O comportamento do percentual inibição entre os tempos de exposição do ensaio não seguiu o padrão esperado para a contaminação, onde o percentual de inibição geralmente aumenta com o tempo de exposição. Para as amostras coletadas nos pontos 6, 7 e 10, observou-se que o efeito de inibição foi mais pronunciado após 5 minutos de exposição. À medida que o tempo de contato com o organismo-teste aumentou, o percentual de inibição diminuiu. Isso sugere que a perda da bioluminescência no início do ensaio não está associada a morte da bactéria, mas sim a um efeito agudo e pontual no metabolismo da bactéria, possivelmente associado à presença de metais na amostra (YANG *et al.*, 2016).

Para as amostras de elutriato de Ubatuba e Paraty, os resultados foram obtidos para os tempos de exposição de 5, 15 e 30 minutos, e os percentuais de efeitos observados durante esses períodos são apresentados na Figura 17.

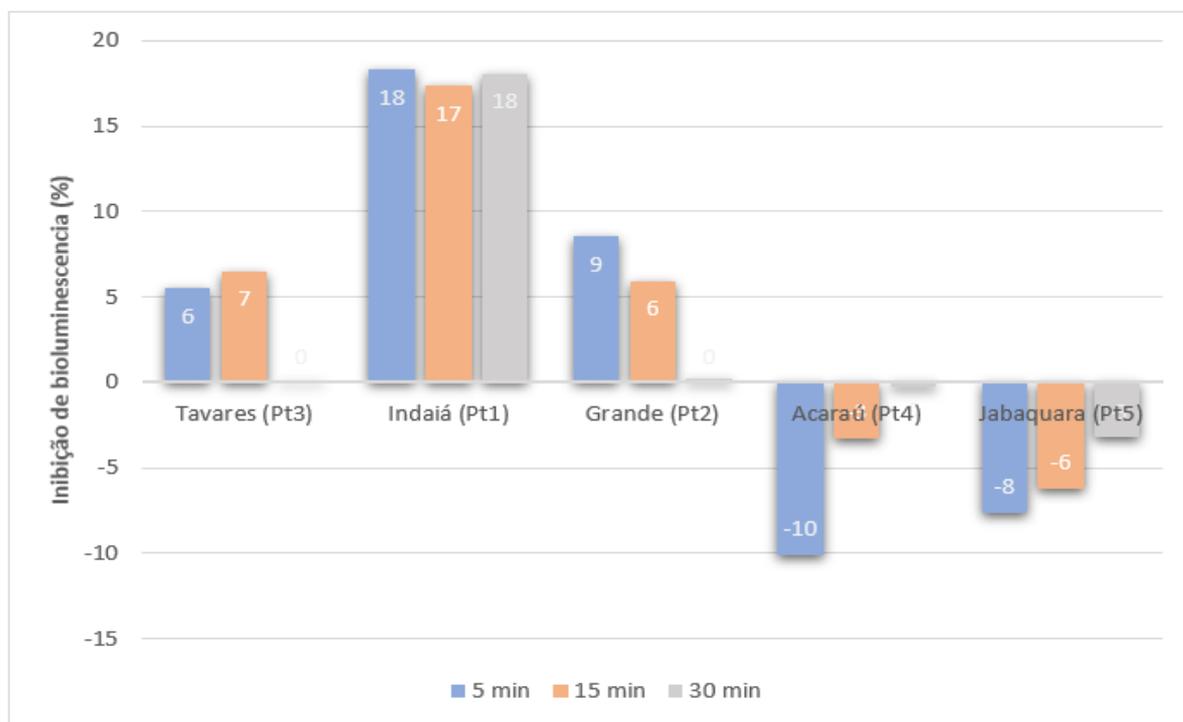
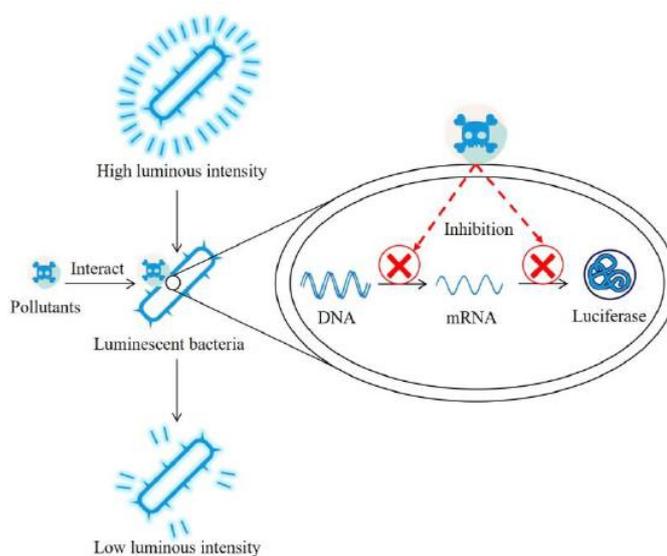


Figura 17: Resultados de % de inibição da bioluminescência obtidos nos ensaios de ecotoxicidade do elutriato dos sedimentos de Ubatuba e Paraty com o organismo-teste *Vibrio fischeri*.

Embora tenha sido realizada uma diluição seriada dos elutriatos, não foi observada uma resposta tóxica significativa (>50% de efeito) nas concentrações analisadas, o que impossibilitou o cálculo do CE50. Portanto, o ensaio ecotoxicológico com os elutriatos dos sedimentos foi expresso em termos de percentual de efeito observado na exposição a uma única concentração, correspondente à maior concentração preparada a partir do elutriato 1:4. O percentual de efeito de inibição nas amostras de Ubatuba e Paraty variou de 0,12% a 18,29%, indicando que os elutriatos analisados não apresentaram toxicidade suficiente para reduzir a bioluminescência das bactérias a níveis críticos (>50%). Com base na descrição de contaminação dessas áreas discutida nos resultados físico-químicos, conclui-se que a resposta do ensaio de ecotoxicidade não exprime a realidade dos impactos antrópicos do local. Outros estudos também reportam essa mesma lacuna dos ensaios biológicos com uso de elutriato em extrato aquoso, devido à não solubilidade de alguns compostos tóxicos presentes no sedimento na fase aquosa (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2023; CHECA-FERNÁNDEZ *et al.*, 2024)

Os elutriatos dos sedimentos de Jabaquara e do rio Acaraú, apresentaram um efeito estressor na bactéria, ocasionando picos de emissão de bioluminescência superiores ao valor observado no controle do ensaio. Tal fenômeno pode ser explicado com base no entendimento do mecanismo de ação da bactéria. Este processo envolve uma interação balanceada entre a luciferase, ácidos flavina reduzido (FMNH₂), aldeído de cadeia longa (RCHO) e oxigênio

molecular ilustrado na Figura 18. A bioluminescência da bactéria é uma luz verde-azulada gerada pela ação da luciferase, que transforma o FMNH₂ e o RCHO, utilizando oxigênio molecular em FMN (flavina mononucleotídeo), ácidos graxos e água (YINGYING et al., 2024). Quando há alterações nas concentrações de Na⁺ e Cl⁻ na presença de certas substâncias tóxicas, como os alguns metais específicos, a emissão de luz sofre picos de emissão (ZHANG et al., 2023). Portanto, investigações mais aprofundadas são necessárias para o completo entendimento deste fenômeno.



Fonte: Zhang et al., 2023.

Figura 18: Esquema que mostra a redução na intensidade luminosa, que ocorre devido à interação das bactérias luminescentes com os poluentes, o que inibe a produção de luciferase ao suprimir os processos de transcrição e tradução. Isso resulta na inibição da reação de luminescência mediada pela luciferase bacteriana, levando a uma diminuição na intensidade luminosa.

Para as amostras de Ubatuba e Paraty, foi possível extrair o líquido intersticial dos sedimentos para a avaliação ecotoxicológica. Os efeitos ecotoxicológicos foram expressos em percentual de efeito, permitindo uma avaliação comparativa da toxicidade do elutriato e do líquido intersticial. Os resultados dos ensaios ecotoxicológicos com a bactéria *Vibrio fischeri* para o ensaio com líquido intersticial são apresentados na Figura 19.

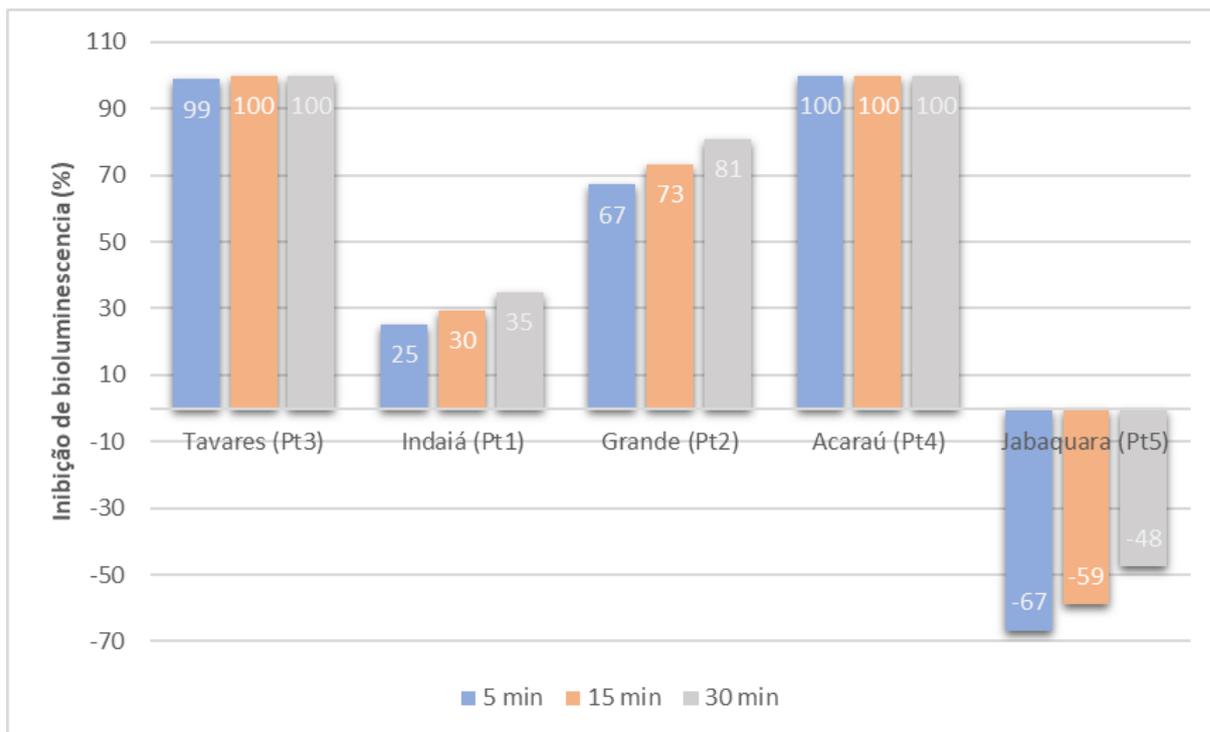


Figura 19: Resultados de % de inibição da bioluminescência obtidos nos ensaios de ecotoxicidade do líquido intersticial dos sedimentos de Ubatuba e Paraty com o organismo-teste *Vibrio fischeri*.

A análise do líquido intersticial mostrou um panorama de contaminação bem diferente dos resultados apresentados no ensaio com elutriato. Evidenciando a questão da sensibilidade do organismo-teste a diferentes preparos da amostra. Para o ensaio com líquido intersticial, as amostras coletadas nos pontos do rio Tavares, Acaraú e Grande mostraram elevada toxicidade, ocasionando 100% de redução da bioluminescência da bactéria para os dois primeiros pontos e 81% para o rio Grande. Fischer *et al.* (2021) destacam a importância da análise do líquido intersticial, evidenciando que o tempo de contato da água com o sedimento e a pressão aplicada para a dessorção dos componentes do interstício alteram a biodisponibilidade de contaminantes do sedimento. Nesse contexto, o sobrenadante mais distante da camada sedimentar tende a apresentar menor toxicidade, especialmente em ambientes mais distantes da fonte poluidora. Por outro lado, a camada mais próxima ao sedimento com maiores concentrações de poluentes, geralmente resulta em uma toxicidade mais elevada. Os autores ainda ressaltam a relevância do estudo dos coeficientes de dessorção e adsorção para prever os impactos ambientais. Embora os ensaios com elutriato não tenham evidenciado toxicidade aguda, esses ambientes ainda merecem atenção quanto à presença de contaminação antrópica.

Além disso, os parâmetros físico-químicos das amostras podem interferir de maneira distinta, dependendo do método de preparo da subamostra para os ensaios. Mehler *et al.* (2009) indicaram que, no caso da avaliação TIE (*Toxicity Identification Evaluation*) de organismos

como *C. dubia* e *H. azteca* em água intersticial, a amônia é identificada como a principal fonte de toxicidade. Em contraste, o TIE para o sedimento integral sugere que compostos orgânicos não polares, especificamente os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, são os principais responsáveis pela toxicidade, com a amônia atuando como um contribuinte secundário. Desta forma, uma análise direcionada, considerando as características específicas de cada ambiente e o organismo-teste selecionado, é essencial para entender os mecanismos de ação e fornecer base sólida para a previsão dos efeitos tóxicos.

O estudo realizado por Ferraz *et al.*, (2020) teve como objetivo comparar os efeitos de contaminantes presentes em sedimentos com diferentes teores de matéria orgânica, analisando sedimentos ricos ou pobres nesse componente. Os autores destacaram que a análise do líquido intersticial e do sobrenadante do sedimento em ambiente aquoso resultou em respostas distintas nos organismos expostos em microcosmo. Esses resultados sugerem que a biodisponibilidade de substâncias tóxicas em sedimentos não é determinada apenas pela sua partição entre as diferentes fases do sedimento (K_{oc} , K_d e K_{ow}), mas também pela ecologia trófica do organismo-teste selecionado.

Embora muitos estudos avaliem a eficácia dos extratos aquosos na avaliação ecotoxicológica (KOVÁTS *et al.*, 2021), há críticas a essa abordagem, pois ela pode não refletir as condições ambientais reais. Em geral, supõe-se que os elutriados aquosos subestimem a quantidade e os efeitos dos contaminantes biodisponíveis (SELIVANOVSKAYA *et al.*, 2010; VERMA *et al.*, 2012). Por outro lado, amostras extraídas com solventes orgânicos tendem a representar melhor as condições ambientais, proporcionando uma quantificação mais precisa das concentrações dos analitos de interesse e demonstrando uma toxicidade superior à observada em extratos aquosos (USEPA, 2001).

Embora apresente limitações, é importante ressaltar que o método de ensaio com elutriado é padronizado e preconizado em normativas nacionais e internacionais, constituindo uma ferramenta importante para a predição da contaminação por compostos orgânicos e metais em sedimentos (DE FREITAS *et al.*, 2024; DE FREITAS *et al.*, 2022; RIBA *et al.*, 2023; SEOK *et al.*, 2022; HWANG *et al.*, 2012; VILLA *et al.*, 2021).

Vários estudos ressaltam a influência da biodisponibilidade de compostos ligados ao material particulado sobre a resposta ecotoxicológica (ČVANČAROVÁ *et al.*, 2013; JAN *et al.*, 2018; SAH *et al.*, 2019; VARSHNEY *et al.*, 2016). Isto sugere que, dependendo do

contaminante estudado, correlacionar seu potencial ecotoxicológico com uma espécie específica de organismo-teste pode ser complexo, uma vez que o contaminante pode estar adsorvido ao material particulado ou depositado no fundo, tornando-se não biodisponível para as espécies que não estão expostas a essas vias de contaminação.

Portanto, a avaliação ecotoxicológica de um ambiente deve abranger o uso de diferentes organismos de múltiplos níveis tróficos da cadeia, avaliar múltiplos compartimentos ambientais, como demonstrado no estudo de Dradrach et al. (2020), que observou uma correlação estatística significativa entre a presença de determinados metais em sedimentos e o efeito tóxico do líquido intersticial desses mesmos pontos de análise sobre o organismo-teste *Vibrio fischeri*. Enquanto a análise do elutriato para este estudo, não apresentou os mesmos resultados. Sendo assim, os resultados apontados nesta tese, apresentaram comportamento semelhante ao descrito pelos autores.

Embora estudos anteriores tenham demonstrado que diferentes solventes afetam os efeitos observados em ensaios com elutriato, é importante destacar que os ensaios de exposição direta geram respostas distintas em relação aos ensaios com elutriato. Isso evidencia a necessidade de incluir ambos os tipos de ensaios nas análises de risco ambiental, uma vez que cada abordagem reflete aspectos diferentes da dinâmica real do local. O trabalho apresentado por de Sá-Salomão et al. (2020) ressalta a importância de considerar múltiplos critérios ao delinear estudos ecotoxicológicos em ambientes aquáticos. Sabendo-se que a matriz sedimentar é formada por uma variedade de compostos, é fundamental considerar ensaios de exposição direta para garantir a representatividade da dinâmica real do local.

Ao comparar os ensaios de contato direto com os elutriatos, os biotestes de contato são claramente recomendados para determinar as frações biodisponíveis de substâncias e as vias de exposição (KLIMKOWICZ-PAWLAS et al., 2019; GONZALEZ-MERCHAN et al., 2014; PAULOVITS et al., 2012). O estudo de Selivanovskaya et al. (2010) apresentou uma análise comparativa de ensaios ecotoxicológicos realizados por contato direto e por medição em elutriatos aquosos, utilizando organismos-teste de três níveis tróficos distintos. Foram utilizadas as espécies *Bacillus pumilus* (bactéria), *Daphnia magna* (microcrustáceo) e *Paramecium caudatum* (protozoário), sendo o *P. caudatum* um organismo-teste de fácil manutenção em laboratório, mostrou-se adequado para ensaios ecotoxicológicos em amostras de ambientes eutrofizados. Este organismo, por ser o início da teia trófica, pode fornecer informações sobre estudos de bioacumulação e biomagnificação para avaliar o potencial de biodisponibilidade e bioacumulação da toxicidade de resíduos e estimar análise de risco. Os resultados obtidos

indicaram que os ensaios de interface (contato entre a matriz sólida e a fase aquosa) foram mais eficientes na avaliação dos efeitos, enquanto os ensaios com elutriatos aquosos não demonstraram risco aos organismos estudados. Além disso, os autores observaram maior sensibilidade dos organismos *Daphnia magna* e *Bacillus pumilis* nos ensaios comparativos.

Em síntese, o bioensaio *in vivo* com a bactéria bioluminescente *Vibrio fischeri*, de acordo com a metodologia adotada, não indicou toxicidade aguda nas amostras preparadas a partir da diluição 1:4 com diluente salino. Ensaios ecotoxicológicos tradicionais não possuem um mecanismo de ação específico para compostos desreguladores endócrinos, por isso, ao avaliar matrizes ambientais, o efeito destes compostos pode estar mascarado. Como a salinidade pode interferir diretamente na dessorção de contaminantes, seria importante investigar a correlação entre esse parâmetro e os dados ecotoxicológicos. Sendo assim, é necessário realizar mais estudos sobre as águas coletadas e os sedimentos, com ênfase na biodisponibilidade e na interação entre as diferentes matrizes.

Além disso, é fundamental desenvolver novos métodos padronizados para a avaliação integrada do ambiente aquático, promovendo a investigação de mais ensaios de interface para avaliar os efeitos agudos, crônicos e avaliações geracionais. Ensaios com exposição direta de curta duração com as soluções padrão preparadas em laboratório dos DE não expressam o verdadeiro impacto das concentrações dos DE na dinâmica ambiental do local, gerando assim resultados de CE50 em concentrações ambientais não relevantes. A metodologia QSAR e biomarcadores também representam boas alternativas para serem incorporados nas avaliações de risco.

4.3 Avaliação comparativa de metodologias de preparo e extração de sedimentos para o ensaio *in vitro* YES

4.3.1 Amostras coletadas no município de Rio das Ostras

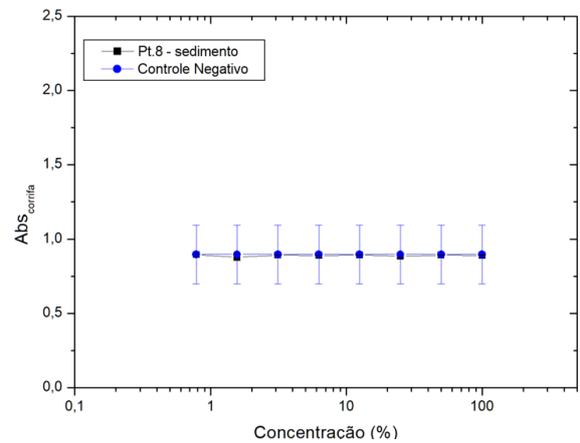
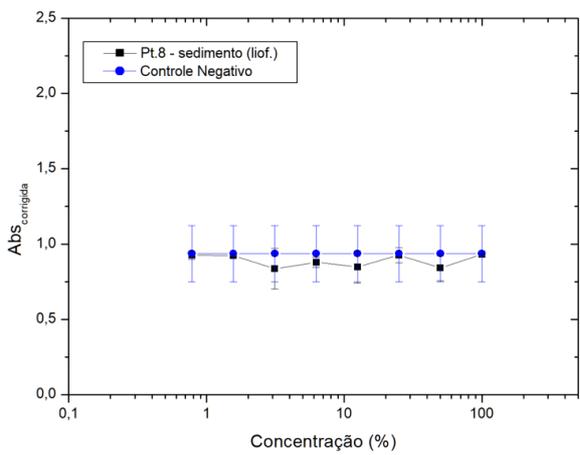
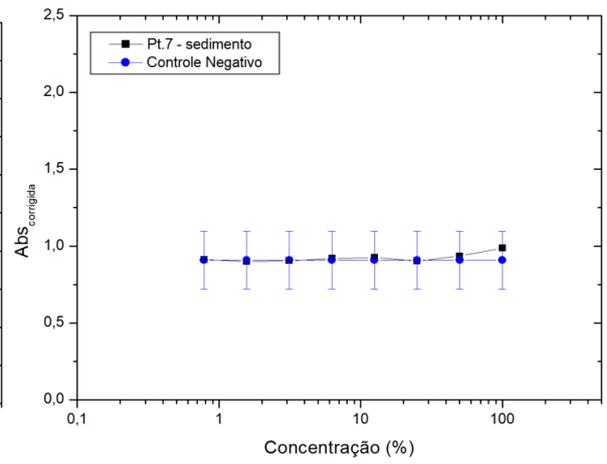
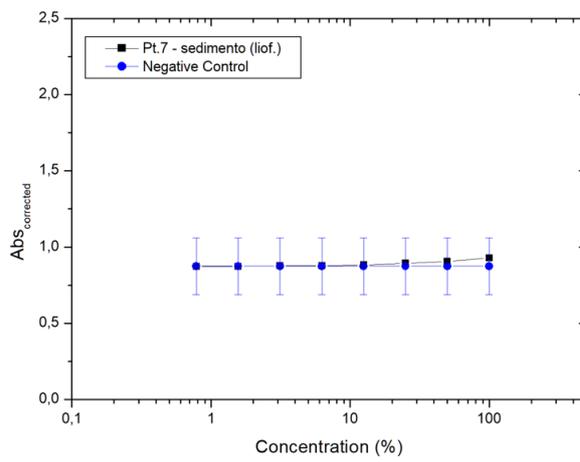
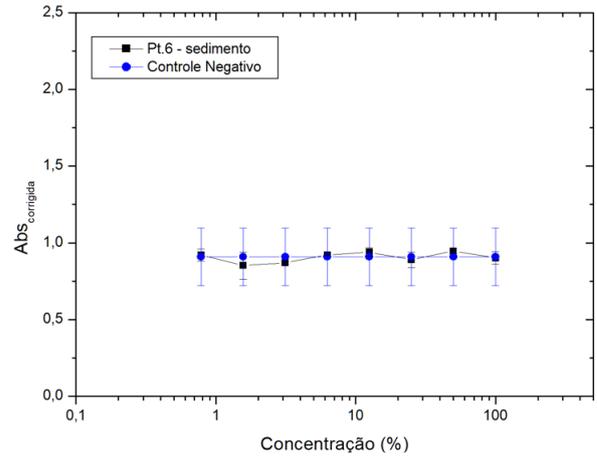
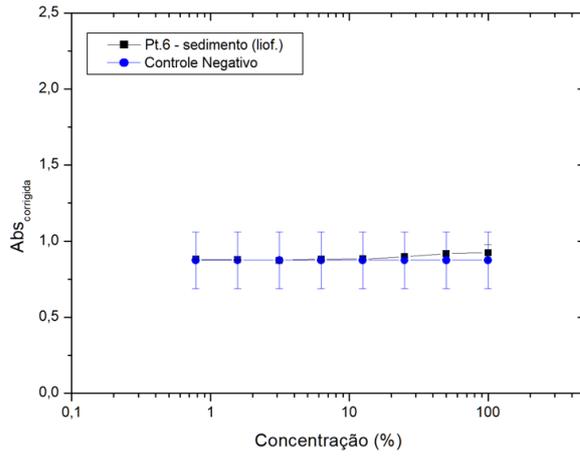
As amostras de sedimento do estuário do rio das Ostras foram coletadas durante a maré baixa, quando a comunicação entre o rio e o mar é interrompida, expondo grandes porções de sedimento. Os pontos de coleta foram distribuídos em duas áreas distintas: uma porção interna do manguezal (2) que compõem o estuário e porção próxima ao rio (3), totalizando cinco pontos de amostragem (Figura 20). Além disso, sob as mesmas condições, foram coletadas duas amostras de água superficial: uma da coluna d'água do rio principal e outra de uma porção de água presente na parte seca do estuário. Esta porção de água pode ser considerada um afloramento de líquido intersticial misturado com resquícios de água superficial do rio, antes de sua maré ser reduzida a zero.



Figura 20: Ilustração dos pontos de coleta realizados no estuário do rio das Ostras.

As amostras de sedimento de Rio das Ostras foram utilizadas na seleção da metodologia mais apropriada para o preparo e extração de DE dessa matriz. O objetivo foi avaliar o efeito da liofilização na resposta do ensaio *in vitro* YES, com ênfase na remoção de interferentes que possam causar citotoxicidade ou reduzir a resposta estrogênica da amostra, comparando os resultados obtidos com sedimentos úmidos. Essa etapa investigativa foi realizada devido às divergências relatadas na literatura quanto à necessidade de liofilização para esse tipo de matriz. As cinco amostras foram analisadas em ambas as condições, sedimento úmido e liofilizado, antes da extração. O método de extração utilizado foi a Extração Assistida por Ultrassom (UAE), descrito no item 3.3.4.2.

A Figura 21 apresenta as curvas dose-resposta obtidas na análise das amostras de sedimento pelo ensaio YES, de acordo com as duas metodologias de preparo avaliadas.



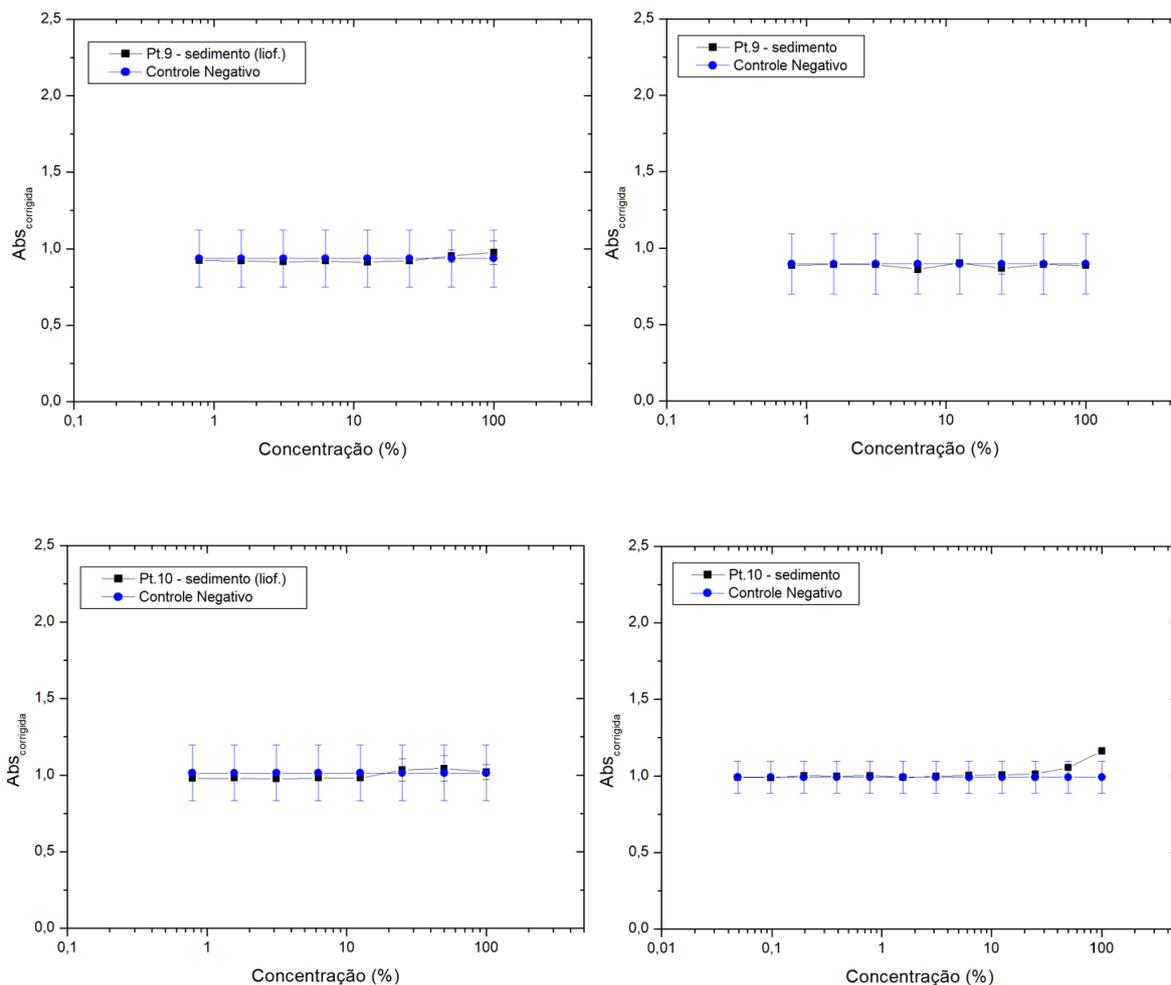


Figura 21: Curvas dose-resposta das amostras de sedimento úmido e liofilizado com a UEA obtidas no ensaio in vitro YES

Os resultados indicaram que a etapa de liofilização não favoreceu a quantificação da resposta estrogênica dos compostos estrogênicos presentes no sedimento. Nos pontos 8 e 9, observou-se, a partir das curvas dose-resposta (Figura 21), que as amostras de sedimentos liofilizadas apresentaram citotoxicidade. Para o ponto 7, a curva dose-resposta apresentou uma pequena melhora para o sedimento úmido, contudo a amostra coletada neste ponto apresentou resposta estrogênica abaixo do limite de detecção do ensaio, inviabilizando o comparativo numérico das respostas do ensaio. O ponto de coleta de sedimento onde foi possível quantificar efetivamente a atividade estrogênica (ponto 10) apresentou o valor de EQ-E2 reduzido para valores inferiores ao limite de detecção do método quando o sedimento liofilizado foi utilizado. Este resultado sugere a perda de compostos estrogênicos durante o processo, dificultando a mensuração do efeito. Adicionalmente, o processo de liofilização pode ter favorecido a preservação e a posterior extração da matéria orgânica, interferindo na resposta do ensaio devido a um aparente antagonismo (Argolo, 2023). Assim, a etapa de liofilização não se mostrou eficiente, representando um esforço adicional no processo sem promover melhorias

nos resultados dos ensaios YES. Diante disso, optou-se por realizar as demais análises utilizando o sedimento seco em estufa a 60°C antes da extração UAE.

Outro aspecto avaliado foi a eficiência dos métodos de extração (QuEChERS e UAE) aplicados aos sedimentos coletados em Rio das Ostras, com o objetivo de identificar o método que proporciona a melhor resposta no ensaio YES. Todas as amostras extraídas pelo método QuEChERS apresentaram inibição do crescimento das leveduras nos poços das placas de ensaios, indicando citotoxicidade. Essa resposta inviabilizou a quantificação da atividade estrogênica das amostras preparadas por esse método de extração. A alta citotoxicidade observada foi atribuída à salinidade intrínseca do extrato obtido pelo método do QuEChERS, tornando esse método inadequado para análise pelo ensaio YES.

A curva dose-resposta da amostra do ponto 10 extraída seguindo a metodologia do QuEChERS, apresentada na Figura 22, indica que o crescimento da levedura ficou abaixo do controle negativo do ensaio, evidenciando a citotoxicidade associada à amostra. Essa citotoxicidade foi confirmada pelos resultados do percentual de inibição de crescimento celular, obtido pela Equação 3, que indicaram variação entre 24% a 95% para as amostras analisadas. Em todas as amostras, o comportamento citotóxico foi similar, apresentando alta citotoxicidade nas maiores concentrações.

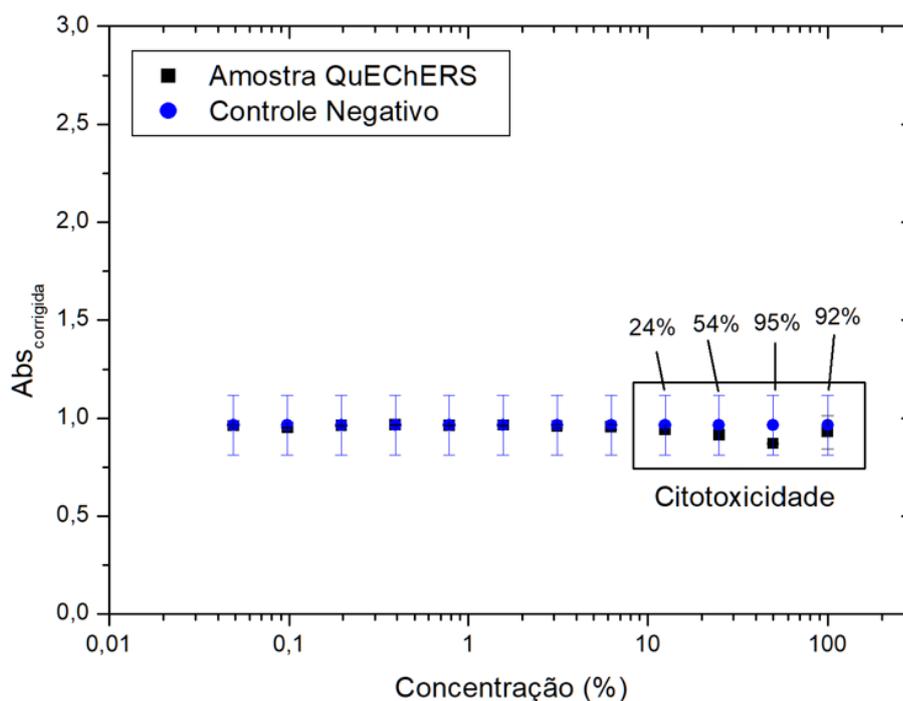


Figura 22: Curva dose-resposta da amostra de sedimento do ponto 10 extraída segundo a metodologia QuEChERS para o ensaio YES.

A partir dos ensaios preliminares, todas as amostras seguiram o protocolo de preparo e extração do sedimento sem liofilização, utilizando o método de ultrassom associado a solvente

(UAE - item 3.3.4.2). A avaliação do potencial estrogênico das amostras indicou que os sedimentos coletados nos pontos 6, 7, 8 e 9 não apresentaram respostas quantitativas de atividade estrogênica no ensaio YES. Contudo, isso não significa que essas áreas estejam livres de contaminação por DE, pois respostas antagonistas e antiestrogênicas devem ser avaliadas no cenário de contaminação (GOMES, 2021). Além do mais, a amostragem dos pontos foi realizada em período chuvoso, o que poderia influenciar na disponibilidade dos compostos no sedimento.

A Tabela 6 apresenta os resultados do potencial estrogênico das amostras de água e sedimento de Rio das Ostras obtidos pelo ensaio YES, com seus respectivos limites de detecção e citotoxicidade apresentada em cada amostra.

Tabela 6: Dados de atividade estrogênicas em EQ-E2 para o ensaio in vitro YES das amostras de água e sedimento coletadas em Rio das Ostras.

PT	Matriz	EQ-E2 (ng L ⁻¹ ou ng g ⁻¹)		Citotoxicidade na diluição (%)	Limite de Detecção – LD (ng L ⁻¹ ou ng g ⁻¹)	Efeito Observado
		Média	Desvio			
6	sedimento	<LD	-	0	0,001	NR
	sedimento (liof.)	<LD	-	0	0,001	NR
7	sedimento	<LD	-	0	0,001	NR
	sedimento (liof.)	<LD	-	0	0,001	NR
8	água	<LD	-	0	0,012	NR
	sedimento	<LD	-	0	0,001	NR
	sedimento (liof.)	<LD	-	0	0,001	NR
9	água	0,34	-	0	0,012	NR
	sedimento	<LD	-	0	0,001	NR
	sedimento (liof.)	<LD	-	0	0,001	NR
10	sedimento	0,16	8,30E-05	0	0,001	NR
	sedimento (liof.)	<LD	-	0	0,001	NR

Legenda: (-) atividade estrogênica quantificada; (N) nenhum efeito observado; (E) atividade estrogênica observada (potencialização do efeito do 17β-estradiol adicionado); (NR) avaliação de atividade antiestrogênica não realizada.

Os pontos 6 e 7 correspondem a áreas de manguezal protegidas por Áreas de Preservação Permanente (APP) localizadas na margem direita da foz do rio das Ostras. Desde

2017, essas áreas estão sob processo de revitalização como parte do Plano Municipal de Conservação e Recuperação da Mata Atlântica, desenvolvido em parceria com a Secretaria de Estado do Ambiente (Rio de Janeiro, 2017).

Embora não tenham sido obtidos valores de EQ-E2 nas amostras coletadas nesses pontos, as áreas em questão sofrem com ações antrópicas. Por isso, é importante avaliar as características ambientais para avaliar a susceptibilidade da área à contaminação por DE. Os processos de sorção desses compostos geralmente ocorrem de forma espontânea e exotérmica, dependendo de fatores químicos e físicos (Qi et al., 2014). Temperaturas relativamente altas podem reduzir a hidrofobicidade dos hormônios e promover o desprendimento da MO para a fase aquosa, tornando o ambiente menos favorável à sorção nos sedimentos (DAI *et al.*, 2022). A área de estudo é um ambiente de clima tropical, contudo as temperaturas das águas superficiais não foram avaliadas no momento da coleta. No entanto, segundo o Relatório de Caracterização da Região Hidrográfica Macaé e das Ostras - RD01 (Rio de Janeiro, 2012), as águas superficiais desta região apresentam temperaturas de $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, com os valores mais altos registrados durante o verão. Esse cenário pode aumentar a susceptibilidade à presença de DE nas águas superficiais.

Considerando ainda o estudo de Dai *et al.* (2022), quando o percentual de carbono orgânico em sistemas sedimento/água é baixo, a adsorção de compostos tem maior correlação com o tamanho das partículas inorgânicas, sendo a argila o principal adsorvente dos hormônios. Os sedimentos analisados apresentaram granulometria média/fina (areia fina siltosa) e baixa presença de matéria orgânica em sua composição (COT = 3,91 e 3,79 mg. g⁻¹, respectivamente e MO = 2,7%). Estes fatores associados ao teor de umidade de 24 % sugerem que a matriz aquosa dessa região precisa ser avaliada para detectar a presença de DE neste ambiente.

Outro fator a ser considerado é a dinâmica estuarina, pois estes ambientes são mais suscetíveis à contaminação em períodos de maior influência das correntes fluviais em direção à foz, quando ocorre o transporte de contaminantes. Em virtude disto, os resultados das caracterizações físico-químicas das subamostras de sedimentos coletados confirmam que a dinâmica do mangue estava sob maior influência oceânica (salinidade 17 e 18, respectivamente), contribuindo para o processo de autodepuração e dispersão de contaminantes. Ademais, a salinidade associada ao pH mais ácido (5,94 e 5,5, respectivamente) atua como um fator de *salting out* dos compostos, favorecendo a solubilidade de DE em água.

Dai *et al.* (2022) relataram que a matéria orgânica dissolvida (*Dissolved Organic Matter* - DOM) e a matéria orgânica suspensa (*Suspended Organic Matter* - SOM) afetam fortemente na distribuição de DE, em especial os hormônios esteróides, na interface sedimento/água,

atuando como a fase orgânica da água e alterando assim a hidrofobicidade do DE em meio aquoso. Os autores ainda pontuam que valores elevados de matéria orgânica na água diminuem a interação dos DE com os sedimentos. Os elutriados destes pontos apresentaram valores de turbidez de 51 UNT para o ponto 6 e de 53 UNT, sugerindo que a presença de sólidos suspensos pode atuar como mecanismo de transporte dos DE do sedimento para a água.

Nos pontos 8 e 9, as análises das águas superficiais revelaram comportamentos distintos em relação à atividade estrogênica. No ponto 8, os valores de Eq-E2 na fração de água superficial coletada no leito do rio durante maré baixa, caracterizado como estuário úmido, foram inferiores ao limite de detecção do método ($LD = 0,012 \text{ ng. L}^{-1}$). Em contraste, no ponto 9, foi registrado um valor de $0,34 \text{ ng L}^{-1}$ de EQ-E2 em uma amostra composta por líquido intersticial misturado com resquício de água superficial do rio, também coletada em baixa maré. No entanto, as análises realizadas nos sedimentos desses dois pontos não indicaram um potencial estrogênico.

No entanto, ao avaliar valores de condutividade, íons e salinidade nas amostras de água e sedimento coletadas nesses pontos, observou-se que esses parâmetros contribuem para o transporte de DE entre os compartimentos ambientais. Embora a amostra de água superficial tenha apresentado potencial estrogênico, as amostras de sedimento desses pontos apresentam uma granulometria relativamente maior em comparação com os outros pontos analisados, o que reduz a suscetibilidade à adsorção de DE.

No ponto 9, a fração de água apresentou atividade estrogênica, sugerindo que a alíquota de água composta pelo líquido intersticial apresenta valores elevados de condutividade e salinidade, fatores que podem influenciar o transporte de DE, possivelmente devido a presença de íons. A análise da água superficial deste ponto revelou valores de $17,34 \text{ mg. L}^{-1}$ para DQO e $6,18 \text{ mg. L}^{-1}$ para o COT, ambos os parâmetros utilizados como indicadores da presença de matéria orgânica.

Neale et al. (2009) relataram que a sorção de hormônios esteróides na matéria orgânica (MO) atinge níveis máximos em condições de pH ácido, enquanto apresenta uma redução, de até 14 vezes, em pH alcalino. Esse comportamento é atribuído à forma não dissociada da MO em condições ácidas, o que favorece a interação com os compostos. Em contrapartida, em pH alcalino ($\text{pH} > 8,7$), o grupo fenólico dos estrogênios sofre dissociação gradativa, resultando na formação de ânions orgânicos que diminuem a sorção em sistemas aquosos de solo e sedimento (Zhang et al., 2013). Zhang et al. (2013), corroboram essa dinâmica ao demonstrar que a capacidade de sorção do estrona (E1) em sedimentos mantém-se praticamente constante no

intervalo de pH entre 5 e 8, mas reduz-se em aproximadamente 29,4% com o aumento do pH de 8 para 11.

Esses resultados destacam a importância da caracterização da matéria orgânica natural (MON) e sua interação com contaminantes orgânicos sob diferentes condições ambientais. A medição indireta de compostos aromáticos e insaturados, como ácidos húmicos e fúlvicos frequentemente associados à MON, é essencial para compreender a dinâmica desses sistemas. No presente estudo, a concentração desses compostos, estimada pelo parâmetro UV a 254 nm, foi maior no ponto 9, indicando uma maior presença de MON nesse local. Essa variação na MON pode influenciar significativamente os processos de sorção e transporte de compostos orgânicos no ambiente. Essas evidências reforçam a relevância de monitorar parâmetros físico-químicos, como o pH, para avaliar a mobilidade e a bioacessibilidade de contaminantes em solos e sedimentos.

Além disso, a análise dos resultados de ecotoxicidade indicou que o ponto 9 apresentou o maior percentual de inibição de bioluminescência em relação ao organismo-teste *Vibrio fischeri*, atingindo 34% de inibição. Esse resultado evidencia o efeito da matéria orgânica como um potencial fator estressor, contribuindo não apenas para a detecção de DE no ambiente, como também para a amplificação de efeitos tóxicos observados. A interação entre a matéria orgânica e os DE pode intensificar os impactos ambientais, destacando a relevância de monitorar ambos os fatores para compreender os riscos ecológicos associados.

As proximidades do ponto de coleta 10 correspondem a uma área historicamente destinada à pesca e captura de mariscos, caranguejos e ostras, mas que, atualmente, é utilizada predominantemente como local de atracamento de embarcações, incluindo uma marina em operação. A degradação ambiental observada neste local contribuiu para a redução das atividades de pesca artesanal, resultando em uma significativa alteração no uso da região.

Os sedimentos coletados no ponto 10 apresentaram resposta estrogênica no ensaio YES, com valor de Eq-E2 de 0,16 ng g⁻¹, sugerindo a presença de desreguladores endócrinos (DE). A afinidade destes compostos por frações orgânicas do sedimento pode ser explicada pelas características físico-químicas locais. Esse ponto destacou-se por apresentar o maior teor de matéria orgânica (2,9%) da área estudada, o maior teor de carbono orgânico total (COT, 4,17 mg g⁻¹), um teor de umidade elevado (25,63%) e pH ligeiramente ácido (5,69). Essas condições criam um ambiente favorável para a retenção de compostos lipofílicos, como os estrogênios.

A análise do elutriato do ponto 10 revelou a complexidade do sistema estuarino, evidenciada por parâmetros físico-químicos específicos. Destacam-se a condutividade de $0,3742 \text{ mS cm}^{-1}$, a qual está associada a disponibilidade de íons para os processos químicos de sorção, o alto valor de UV 254 nm (3,112), que indicam presença de ácidos húmicos e fúlvicos que complexam os DE, e uma DQO de $26,87 \text{ mg L}^{-1}$, a qual é uma medição indireta da presença de matéria orgânica na matriz. Esses dados, associadas às concentrações de nitrito ($0,291 \text{ mg L}^{-1}$) e nitrato ($0,071 \text{ mg L}^{-1}$) e ao pH neutro (7,42), sugerem uma interação significativa entre a matéria orgânica dissolvida e os contaminantes emergentes presentes na matriz sedimentar. A alta concentração de compostos aromáticos e insaturados, representada pelo parâmetro UV 254 nm, pode desempenhar um papel relevante na mediação do transporte e da disponibilidade de DE no ambiente.

Apesar dessas condições, o ensaio de ecotoxicidade, baseado na inibição da bioluminescência do *Vibrio fischeri*, apresentou resposta pouco expressiva. Esse resultado pode ser atribuído à incompatibilidade do método de análise usando o elutriato com as vias de exposição do organismo aos compostos no ambiente. A baixa biodisponibilidade imediata dos compostos, provavelmente devido à forte adsorção nas frações orgânicas e à granulometria fina do sedimento, pode ter influenciado os resultados. Este sedimento apresentou a menor granulometria entre os pontos analisados na região de Rio das Ostras. A granulometria fina aumenta a superfície específica, favorecendo a retenção de contaminantes. Além disso, durante o processo de elutriação, a solução é submetida a centrifugação, o que pode ter limitado a mobilidade e disponibilidade dos contaminantes adsorvidos nas partículas finas, reduzindo sua interação com os organismos.

As amostras foram analisadas por HPLC-FLU/DAD com o objetivo de identificar e quantificar desreguladores endócrinos (DE). Entretanto, devido a problemas operacionais no equipamento, não foi possível realizar as curvas de calibração necessárias para a quantificação dos compostos. Ainda assim, a interpretação dos cromatogramas baseou-se na identificação dos tempos de retenção de cada composto individualmente quando injetados isoladamente e assim, posterior identificação da presença de picos nos respectivos tempos de retenção nos cromatogramas das amostras analisadas. Permitindo a identificação qualitativa dos DE nas amostras. A Tabela 7 apresenta os compostos identificados, organizados conforme seus tempos de retenção e padrões cromatográficos característicos. Os cromatogramas detalhados de cada amostra estão disponíveis no Anexo 3.

Tabela 7: Relação dos compostos identificados em cada ponto amostral a partir da identificação de similaridade de picos cromatográficos.

Composto		E1	E2	E3	EE2	BPA	NP
Tempo			7,041	3,977	8,692	8,156	
Amostra	Matriz	Pico	Pico	Pico	Pico	Pico	Pico
6	SED	NO	SIM	NO	SIM	NO	NO
7	SED	NO	SIM	NO	SIM	NO	NO
8	SED	NO	SIM	NO	SIM	SIM	NO
	AS	NO	SIM	SIM	NO	NO	NO
9	SED	NO	SIM	NO	NO	NO	NO
	AS	NO	SIM	NO	NO	NO	NO
10	SED	NO	SIM	SIM	SIM	SIM	NO

Legenda: (NO) não observada semelhança do pico cromatográfico; (SIM) similaridade no pico cromatográfico no tempo de retenção do composto; (AS) água superficial; (SED)

Embora a abordagem adotada neste trabalho não permita quantificar concentrações absolutas, ela fornece dados relevantes sobre a presença ou ausência de compostos-alvo. Com base nessa avaliação qualitativa foi possível identificar que nos pontos onde houve quantificação de EQ-E2 pelo ensaio YES, também houve identificação de DE pelo método cromatográfico. Apesar de ter sido identificado qualitativamente a presença de E2 em todos os pontos, essa informação não pode estar associada a uma falha na avaliação do ensaio YES, uma vez que a sensibilidade dos métodos interfere na detecção e quantificação dos compostos. Ademais, analisando os cromatogramas disposto no ANEXO 3, é possível observar que a intensidade dos picos para as amostras 6, 7, 8 (tanto água quanto sedimento) e 10 foi muito baixa, sendo assim necessário uma validação da curva para quantificar se as concentrações nesses pontos são efetivamente uma presença de DE na amostra ambiental ou se podem ser considerados apenas ruído da linha de base do cromatograma.

Um dos principais desafios para o avanço das pesquisas sobre contaminação por DE em sedimentos é o estabelecimento de metodologias analíticas de extração, identificação e quantificação desses analitos nessa matriz (BIAŁK-BIELIŃSKA *et al.*, 2016). Os resultados obtidos nas análises *in vitro*, *in vivo* e química indicaram concentrações abaixo do limite de detecção dos métodos, o que muitas vezes é interpretado como um indicativo de baixo risco ambiental para determinada área. Contudo, a matriz sedimento apresenta uma grande variabilidade em sua composição granulométrica, mineralógica, teor de carbono orgânico, além de outras substâncias interferentes, que podem impactar a interpretação dos resultados obtidos nos ensaios químicos e biológicos. Ainda foi possível perceber que a dinâmica ambiental favorece ou não a detecção de compostos em determinados compartimentos ambientais, sendo

necessária uma análise conjunta para uma real medição de risco. Dessa forma, os sedimentos são considerados uma matriz de alta complexidade para avaliação de impactos ambientais.

O bioensaio *in vitro* YES é um modo eficaz para avaliar o potencial estrogênico das amostras, quando estas apresentam substâncias estrogênicas que agem pelo mecanismo de ação de ligação ao receptor. Para as amostras analisadas, foi possível detectar atividade estrogênica no ponto de água superficial do ponto 9 e na amostra de sedimento integral do ponto 10. Os demais pontos analisados apesar de não apresentarem potencial estrogênico, precisam ser investigados quanto ao potencial antiestrogênico. Isto se dá porque matrizes ambientais complexas apresentam substâncias com comportamento antagonista que enfraquecem a eficiência do ensaio YES. Para superar estes interferentes, a metodologia de antiestrogênio dispõe de uma etapa posterior com a adição de E2 diretamente na placa de análise. Contudo, o resultado obtido para esta etapa é baseado em um método quantitativo e possui a limitação de não identificar a presença de compostos antagonistas quando o ensaio YES expressa resposta positiva para atividade estrogênica. Desta forma, futuros estudos estão sendo desenvolvidos para aprimorar a forma de detecção de comportamento antiestrogênico no ensaio.

Adicionalmente, observou-se que a presença de interferentes influenciou os resultados dos métodos de preparo de amostras sedimentares para avaliação de DE. Embora as análises cromatográficas não tenham permitido a quantificação dos compostos, foi possível realizar uma identificação qualitativa baseada na similaridade de picos dos compostos nos cromatogramas e tempos de retenção. Esses resultados indicaram a presença de DE nos compartimentos ambientais analisados.

Para superar essas limitações, foi realizado um aprimoramento no procedimento de extração das amostras coletadas em Ubatuba e Paraty. Adicionalmente, conduziu-se um experimento utilizando sedimentos dopados, com o objetivo de avaliar a eficiência de recuperação dos compostos e a dinâmica de migração entre os compartimentos ambientais analisados.

4.3.2 Amostras coletadas nos municípios de Ubatuba e Paraty

A partir dos resultados obtidos nas amostras coletadas em Rio das Ostras, foi iniciada uma nova etapa investigativa com ênfase na dinâmica dos DE em ambientes aquáticos, considerando também sua associação com o material particulado presente na água superficial. Nesse contexto, foram analisados o material particulado retidos nas membranas usadas para a filtração da água no laboratório, conforme descrito no item 4.3.2. Os resultados obtidos para a

água superficial filtrada, material particulado foram avaliados para investigar a capacidade de transferência de contaminantes entre os diferentes compartimentos ambientais.

Simultaneamente, as amostras coletadas nesses pontos também foram avaliadas qualitativamente segundo seu potencial antiestrogênico, com adição de E2 em concentração única conhecida em todos os pontos da placa de ensaio, conforme descrito no item 3.3.8. A citotoxicidade das amostras também foi avaliada individualmente para cada poço de análise segundo metodologia descrita no item 3.3.8. A Tabela 8 apresenta os resultados de EQ-E2 obtidos no ensaio YES, bem como o desvio padrão entre as réplicas, o limite de detecção do método, a citotoxicidade encontrada na amostra concentrada e o efeito observado no ensaio antiestrogênico para as amostras coletadas em Ubatuba e Paraty.

A metodologia de extração usando o ASE foi testada para todos os sedimentos destas áreas de estudo. Contudo, o ensaio YES apresentou resultados de não expressão de estrogenicidade mesmo com a adição de padrões na amostra. Com isso, os resultados apresentados seguiram apenas o uso da metodologia UAE. Todos os sedimentos foram analisados com réplicas do processo de extração, resultando em dois extratos de sedimento provenientes da mesma amostra para cada ponto de coleta. Esses extratos foram analisados tanto pelo ensaio *in vitro* YES quanto nas análises cromatográficas. Os resultados de ambas as réplicas estão apresentados nas Tabelas 8 e 9 e Figuras 23, 24, 25, 26 e 27.

Tabela 8: Valores de EQ-E2 ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$) para amostras de água, material particulado e sedimento coletados em Ubatuba e Paraty, obtidos pelo ensaio YES.

PT	Matriz	EQ-E2 ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ou $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)		Citotoxicidade na diluição (%)	Limite de Detecção – LD ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ou $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)	Efeito Observado
		Média	Desvio			
1	água	<LD	-	0	0,047	E
	MP	<LD	-	0	0,047	E
	sedimento (1)	<LD	-	0	0,005	E
	sedimento (2)	0,13	0,01	0	0,005	-
2	água	0,5	0	0	0,005	-
	MP	<LD	-	0	0,047	N
	sedimento (1)	<LD	-	0	0,005	E
	sedimento (2)	<LD	-	0	0,005	E
3	água	5,84	0	0	0,023	-
	MP	1	0,94	0	0,023	-
	sedimento (1)	0,05	0	0	0,001	-
	sedimento (2)	<LD	-	0	0,005	E
4	água	40,3	0,5	0	0,047	-
	MP	1,3	0	0	0,047	-
	sedimento (1)	1,5	0,1	0	0,005	-
	sedimento (2)	1,5	0,1	0	0,005	-
5	água	0,43	0	0	0,012	-
	MP	0,86	0,18	0	0,012	-
	sedimento (1)	0,17	0,01	0	0,001	-
	sedimento (2)	<LD	-	0	0,005	E

Legenda: (-) atividade estrogênica quantificada; (N) nenhum efeito observado; (E) atividade estrogênica observada (potencialização do efeito do 17β -estradiol adicionado); (NR) avaliação de atividade antiestrogênica não realizada.

Os dados apresentados na Tabela 8 indicam que, em pelo menos um dos compartimentos ambientais analisados de cada ponto de coleta, foi possível quantificar a atividade estrogênica. Destaca-se que os pontos 4 e 5 apresentaram os maiores valores de EQ-E2 em todos os compartimentos investigados, com o ponto 4 apresentando os maiores valores em todas as matrizes analisadas. Esse ponto, representativo do estuário do rio Acaraú, é significativamente impactado por atividades antropogênicas, como o lançamento de esgoto *in natura* ao longo do corpo hídrico. Essas condições contribuem para a forte degradação do mangue local disposto no trecho final do rio. Além disso, o local é influenciado pelo aporte de esgoto sanitário da região e apresenta intensa deposição de sedimentos devido às correntes que circulam na enseada (DOS SANTOS E BATALLA, 2017).

A análise de água superficial do ponto 4 revelou os maiores valores de COT e DQO em comparação aos pontos avaliados em Ubatuba, com $31,19\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para DQO e $17,15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

para COT. Esses valores indicam uma elevada presença de matéria orgânica nessa matriz aquática. Embora a lipofilicidade dos DE sugira que matrizes com altos valores de matéria orgânica apresentam maior probabilidade de exibirem maior atividade estrogênica (ARGOLO et al., 2023), é essencial que o preparo das amostras siga procedimentos rigorosos para remoção dessa MO antes do ensaio YES. Isso se deve ao fato de que a MO diretamente exposta pode ser tóxica para a levedura usada no ensaio (GOMES et al., 2023), mascarando, assim, o real potencial estrogênico da amostra.

Mesmo com os valores de matéria orgânica observados, o preparo da amostra de água para avaliação de estrogenicidade se mostrou eficiente, pois foi possível calcular o valor de 40,3 ng. L⁻¹ de EQE2 da amostra sem nenhum tipo de interferentes. Desta forma, infere-se que os DE presentes nessa matriz estavam associados aos elementos orgânicos dissolvidos, e no processo de SPE os analitos foram separados da MO para posterior análise. Este ponto representa o estuário do rio Acaraú, já descrito como um corpo hídrico bastante degradado com ações antrópicas. Além do quadro de poluição físico-química, esse resultado corrobora para a presença de poluição com DE neste ambiente. As curvas dose-respostas para cada uma das subamostras analisadas nesta área estão representadas na Figura 23.

Para a avaliação da estrogenicidade associada ao material particulado (MP) do rio Acaraú, o ensaio YES apresentou valor de 1,3 ng. L⁻¹ de EQE2. A amostra de elutriato deste ponto apresentou valores físico-químicos de 2,029 abs para a espectrometria UV254. Sendo assim, a elutriação neste ponto pode ser associada ao desprendimento de substâncias húmicas e fúlvicas para o material particulado da amostra. Além disto, esta matriz apresentou valores 26,03 mg L⁻¹ de DQO, associado a quantificação de matéria orgânica. Em relação aos parâmetros de nitrito e nitrato, há pouco conhecimento quanto a sua correlação com a presença de DE no ambiente, no entanto este ponto apresentou a maior concentração de nitratos da campanha. O procedimento de extração desta subamostra permitiu calcular o potencial estrogênico, no entanto alguns interferentes foram observados. Esta matriz apresentou citotoxicidade de 26% na quarta diluição na placa de ensaio, indicando que a inclusão de uma etapa adicional de *clean up* com o uso do cartucho SAX para a remoção de substâncias húmicas, uma fração específica de matéria orgânica (Felix *et al.*, 2020) pode ser necessária para uma melhora na quantificação. Essa etapa adicional contribui para mitigar interferências e garantir maior precisão na avaliação da atividade estrogênica.

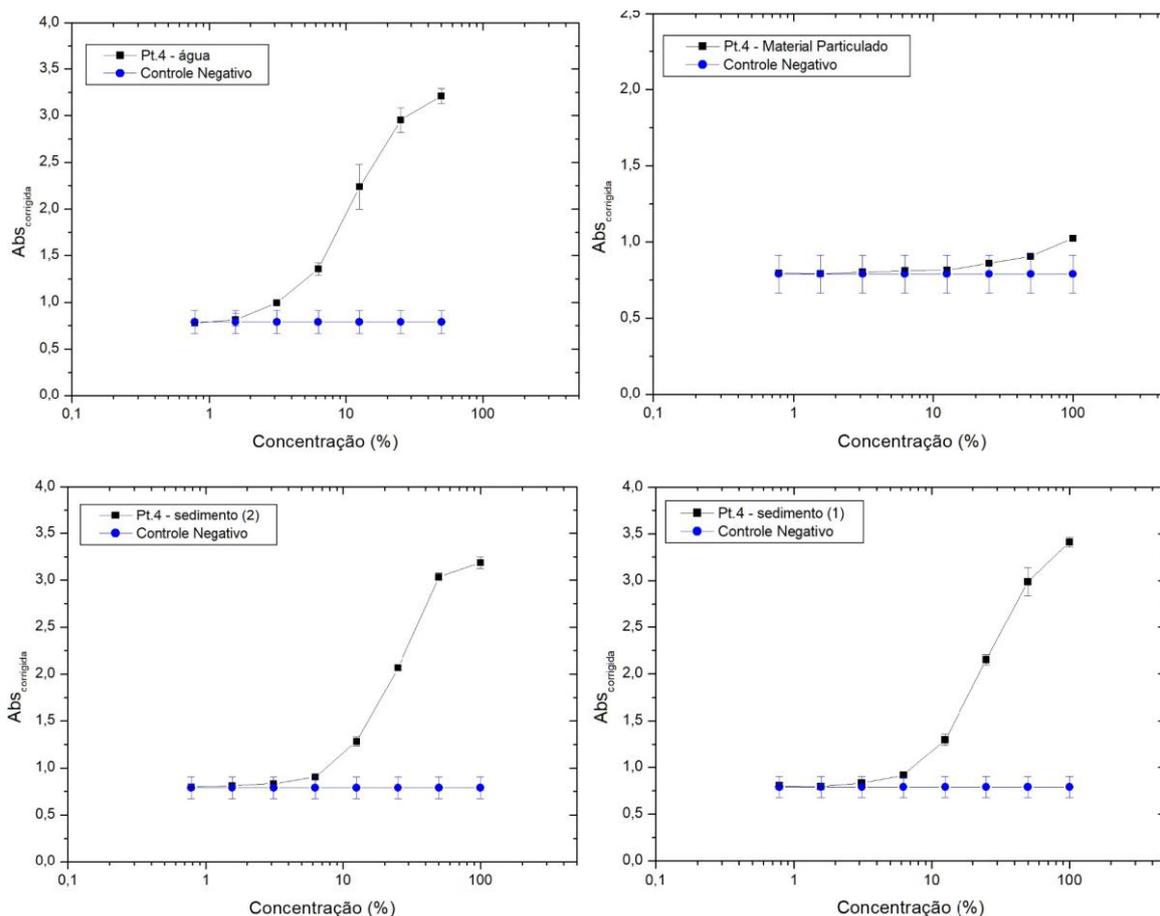


Figura 23: Curvas dose-respostas das amostras de material particulado, água superficial filtrada e sedimento e posterior medição de atividade antiestrogênica para o ponto de coleta 4, rio Acaraú, Ubatuba obtidas no do ensaio *in vitro* YES.

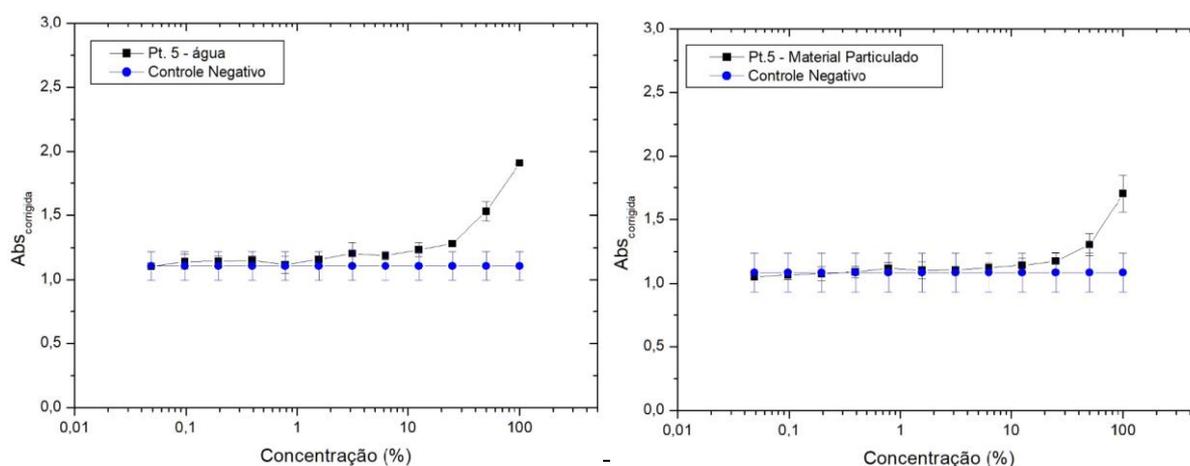
Os sedimentos analisados no ponto 4, apresentou um aspecto granulometria de areia de muito fina composição, com 35,8% de seus espaços intersticiais preenchidos com teor de umidade. Os sedimentos apresentaram $9,07 \text{ mg.g}^{-1}$ de carbono orgânico total e 11,8% de matéria orgânica na sua composição com característica tendendo a neutralidade, com pH 6,6. Este compartimento apresentou atividade estrogênica em ambas as suas réplicas, calculando um valor de $1,5 \text{ ng.g}^{-1}$ de EQE2 sem citotoxicidade aparente nos poços de análise. Este valor foi o maior apresentado entre os pontos de sedimento deste estudo, e é considerado expressivamente alto em relação a outros estudos de sedimentos naturais (Sabino *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2021).

A amostra de sedimento coletada no ponto 5 apresentou uma resposta positiva nos ensaios YES, porém somente um dos extratos de sedimento foi possível calcular o valor de $0,17 \text{ ng.g}^{-1}$ EQ-E2. No entanto, quando foi realizada a análise de atividade antiestrogênica, o sedimento apresentou uma baixa potencialização do efeito de E2. Esta resposta pode indicar que compostos estrogênio podem estar associados aos sedimentos em concentrações muito

baixas, que não chegam a expressar resposta estrogênica. Este ponto de análise corresponde à área de estudo da praia de Jabaquara e as curvas dose respostas do ensaio YES estão expostas na Figura 24. O sedimento desta região é lamoso com finos constituintes. Esta região é extensão de uma vasta área de mangue preservada com correntes sedimentares intensas. Muitas instituições utilizam esta região para coletar sedimentos controle para cultivos de organismos bentônicos em laboratório. Apesar de ser o ponto com maior constituição orgânica, em relação aos pontos deste estudo, com valores de $24,82 \text{ mg.g}^{-1}$ de carbono orgânico total e 11,8% de matéria orgânica, sugerindo forte afinidade de DE com este sedimento, o resultado do ensaio YES apresentou resposta menor que o sedimento do rio Acaraú. Comparativamente, o aporte de contaminantes no estuário Acaraú é maior que em Jabaquara.

Esta análise se repete na resposta obtida para a água superficial, onde foi encontrado um valor de $0,43 \text{ ng.L}^{-1}$ de EQE2, sendo quantificada uma DQO de $78,57 \text{ mg.g}^{-1}$ e $25,73 \text{ mg.g}^{-1}$ de carbono orgânico total. Esta análise reforça a importância de uma avaliação abrangente para caracterização de poluição de determinada localidade. Uma ação integrativa permite justificar a ausência de DE no ambiente mesmo quando há parâmetros físico-químicos que indiquem um favorecimento de adsorção de DE na área. Ter a caracterização da área permite que o ambiente seja mantido preservado, com a implementação de políticas de monitoramento que impeçam o despejo de contaminantes de preocupação emergentes no meio.

A fração de material particulado analisado, apresentou valores de $0,86 \text{ ng.L}^{-1}$ de EQE2. Esses resultados reforçam a importância de prosseguimento do estudo sobre o transporte de contaminantes no meio, pois pode indicar que há uma troca contínua dos poluentes entre sedimento e água.



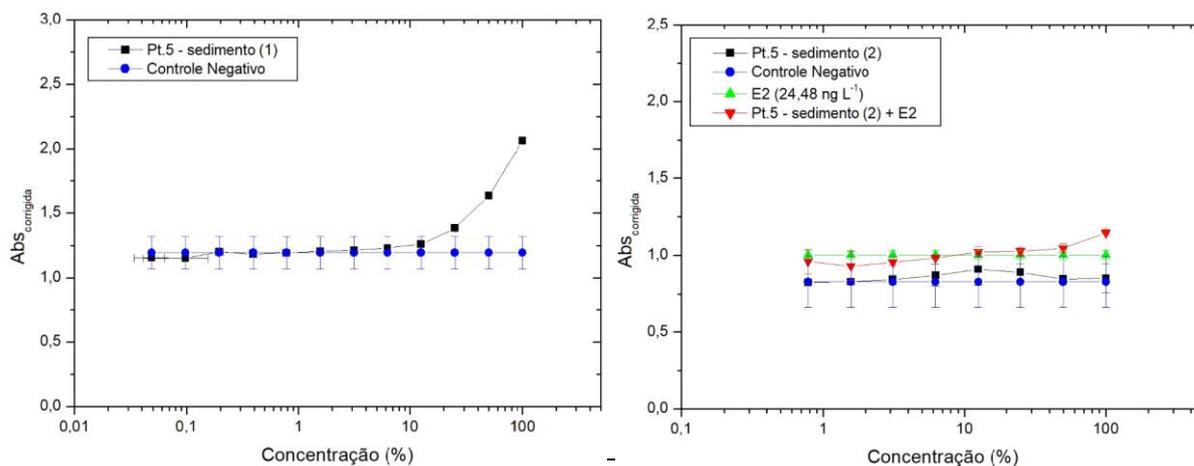


Figura 24: Curvas dose-respostas das amostras de material particulado, água superficial filtrada e sedimento e posterior medição de atividade antiestrogênica para o ponto de coleta 5, praia de Jabaquara, Paraty obtidas do ensaio *in vitro* YES.

O ponto 1 corresponde ao estuário do rio Indaiá, situado em uma área cercada por unidades de conservação. A análise granulométrica revelou a predominância de areia fina e média, característica já descritas por Marconi e Abrahão (1975) ao avaliarem os estuários do litoral de Ubatuba. Esses autores destacaram que o estuário do rio Indaiá apresenta ampla comunicação com o oceano e circulação de correntes. Além disso, essa área é utilizada como praia salobra por turistas. Os resultados obtidos para amostras de água filtrada e material particulado estiveram abaixo do limite de detecção do método.

A avaliação dos parâmetros físico-químicos do elutriato e da água intersticial, que atuam como vetores de transporte de contaminantes para a coluna d'água, indicou baixos valores de turbidez no elutriato (1,04 UNT), sugerindo uma presença de pouco material particulado. A DQO, utilizada como indicador indireto da presença de matéria orgânica, apresentou os seguintes valores: 10,71 mg·L⁻¹ no elutriato, 15,74 mg·L⁻¹ na água intersticial e 20,0 mg·L⁻¹ na água superficial. Considerando a afinidade dos DE por matéria orgânica e sedimentos de granulometria fina, esses resultados sugerem que o ponto 1 não apresenta condições favoráveis para a adsorção de altas concentrações desses DE.

Para complementar a análise, foi realizado um ensaio de atividade antiestrogênica, no qual o E2 foi adicionado diretamente na placa de ensaio junto com as amostras. Esse procedimento visa investigar se os compostos presentes nas amostras atuam como bloqueadores dos receptores de estrogênio no ensaio YES. A interpretação das curvas dose-resposta (Figura 25) revelou uma potencialização da atividade estrogênica nos compartimentos sedimento e água superficial. Essa resposta foi atribuída à adição de E2, permitiu a detecção da atividade

estrogênica não previamente identificada devido às baixas concentrações de DE, que estavam abaixo do limite de detecção do método.

Por outro lado, no material particulado, observou-se um comportamento antagonista na curva dose-resposta. Esse padrão sugere que, nesta matriz, há compostos que atuam bloqueando os receptores de estrogênio contidos na levedura, reduzindo o efeito esperado do E2 adicionado experimentalmente à placa.

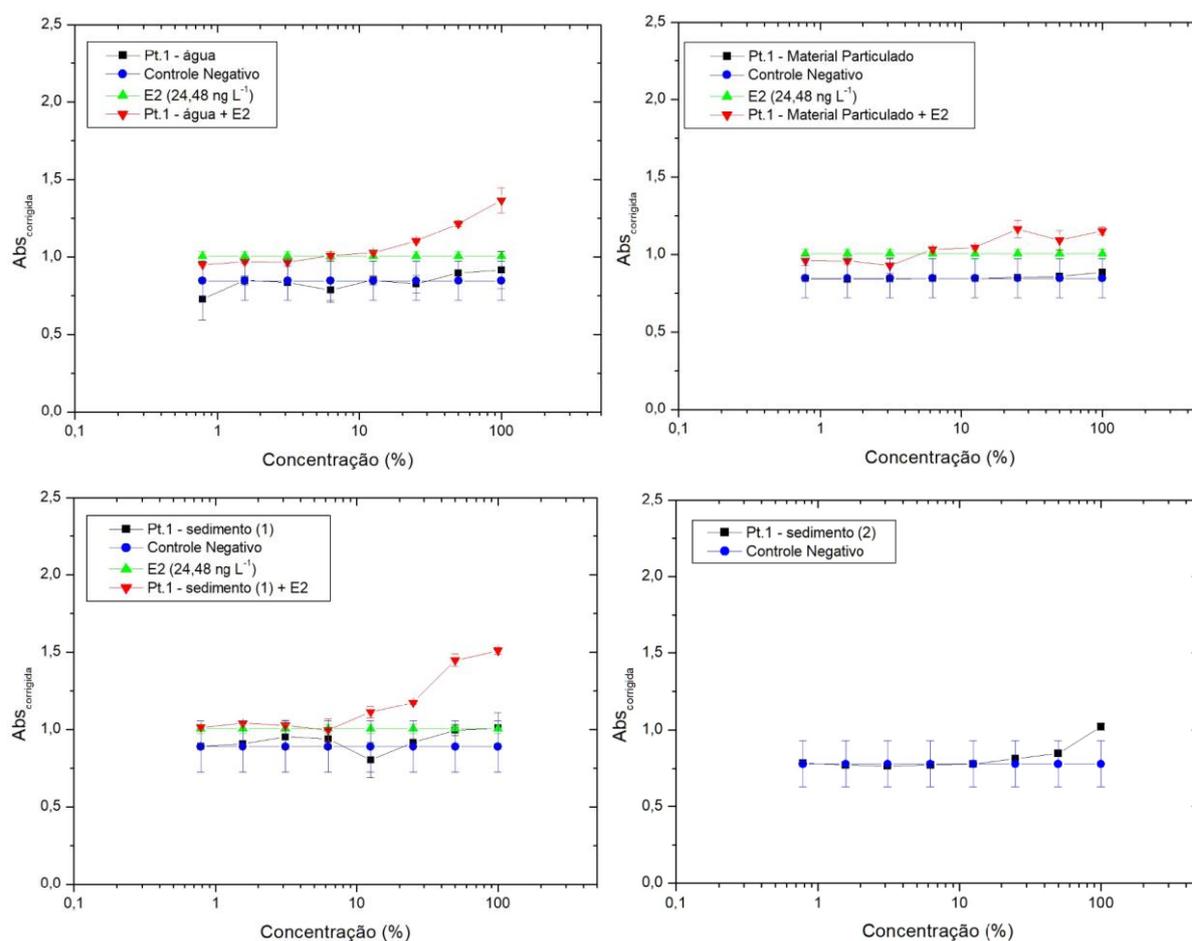
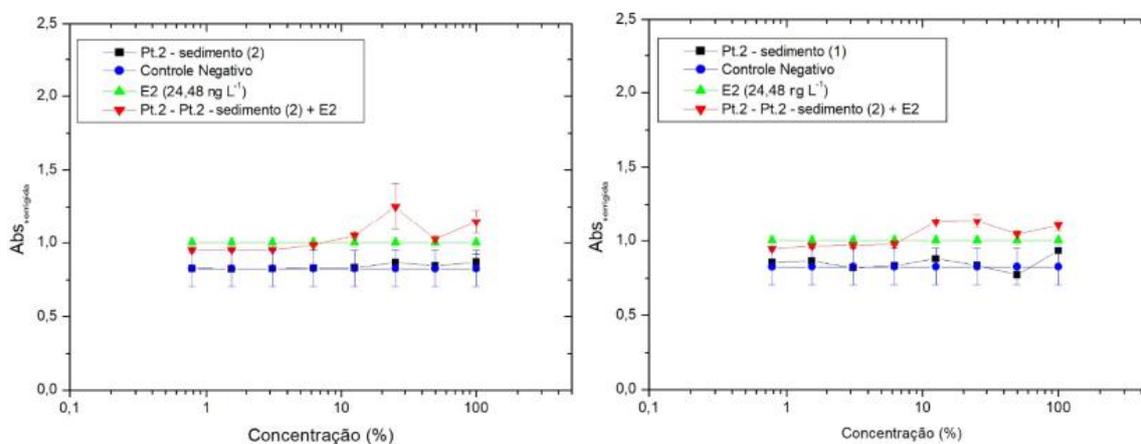


Figura 25: Curvas dose-respostas das amostras de material particulado, água superficial filtrada e sedimento e posterior medição de atividade antiestrogênica para o ponto de coleta 1, rio Indaiá, Ubatuba obtidas no ensaio *in vitro* YES.

Ainda para este ponto a discussão para a matriz sedimento segue parecida com o material particulado e água superficial, pois é possível verificar que este ponto apresentou o segundo menor valor de carbono orgânico total e matéria orgânica, respectivamente, 2,39 mg.g⁻¹ e 1,8 %, sendo que o teor de umidade que está correlacionado com a granulometria do sedimento (maior o teor de umidade indica que mais líquido intersticial é retido entre as partículas do sedimento e isto indica que são grãos mais finos). Contudo, umas das réplicas do sedimento analisado neste local apresentou o valor de 0,133 ng.g⁻¹ de EQ-E2.

O estuário do rio Grande está representado pelo ponto 2. Apresentou uma das maiores granulometrias (areia média). Valores de COT $11,2 \text{ mg.g}^{-1}$ e MO 4,8% nas amostras do sedimento, sendo composto de 38,28% de teor de umidade. É uma área com muitas embarcações e atividade pesqueira. Tem um depósito de lixo a céu aberto no entorno, uma encosta de área abandonada pela prefeitura. Amostra de água superficial com DQO de $24,28 \text{ mg.L}^{-1}$, COT de $9,14 \text{ mg.L}^{-1}$ com pH neutro 7,82, maior valor de condutividade de Ubatuba $75,4 \text{ mS.cm}^{-2}$ com absorvância de 0,75 U de UV $254 \mu\text{m}$ e salinidade 22. Para a água intersticial apresentou DQO de $16,24 \text{ mg.L}^{-1}$ e presença de íons de Na^+ 21,2 ppm e K^+ 7 ppm, esse compartimento interfere no transporte do contaminante para a coluna d'água. O elutriato, por sua vez, sugere os critérios para avaliação do material particulado, uma vez que simula o processo de ressuspensão de partícula do sedimento para coluna d'água. Apresentou baixo valor de DQO $2,74 \text{ mg.L}^{-1}$, turbidez 31 UNT e baixa condutividade elétrica $0,698 \text{ mS.cm}^{-2}$.

Ao analisar as curvas dose-resposta apresentadas na Figura 26, observa-se que, no ensaios YES, não foi detectada atividade estrogênica no material particulado. No entanto, no ensaio antiestrogênico, verificou-se um decaimento da curva nas maiores concentrações, sugerindo uma atividade antiestrogênica na amostra. A amostra de água superficial apresentou atividade com $0,5 \text{ ng.L}^{-1}$ de EQ-E2, sem evidências de citotoxicidade nos extratos analisados para este ponto. Os sedimentos analisados apresentaram um efeito potencializador do E2 no ensaio qualitativo antiestrogênico para ambas as réplicas de sedimento, indicando presença de compostos desreguladores endócrinos, embora suas concentrações não tenham sido mensuradas no ensaio padrão. Com base no comportamento das curvas, ainda é observado um efeito antiestrogênico nas amostras de sedimento, evidenciando a presença de compostos antagonistas nessas amostras ambientais.



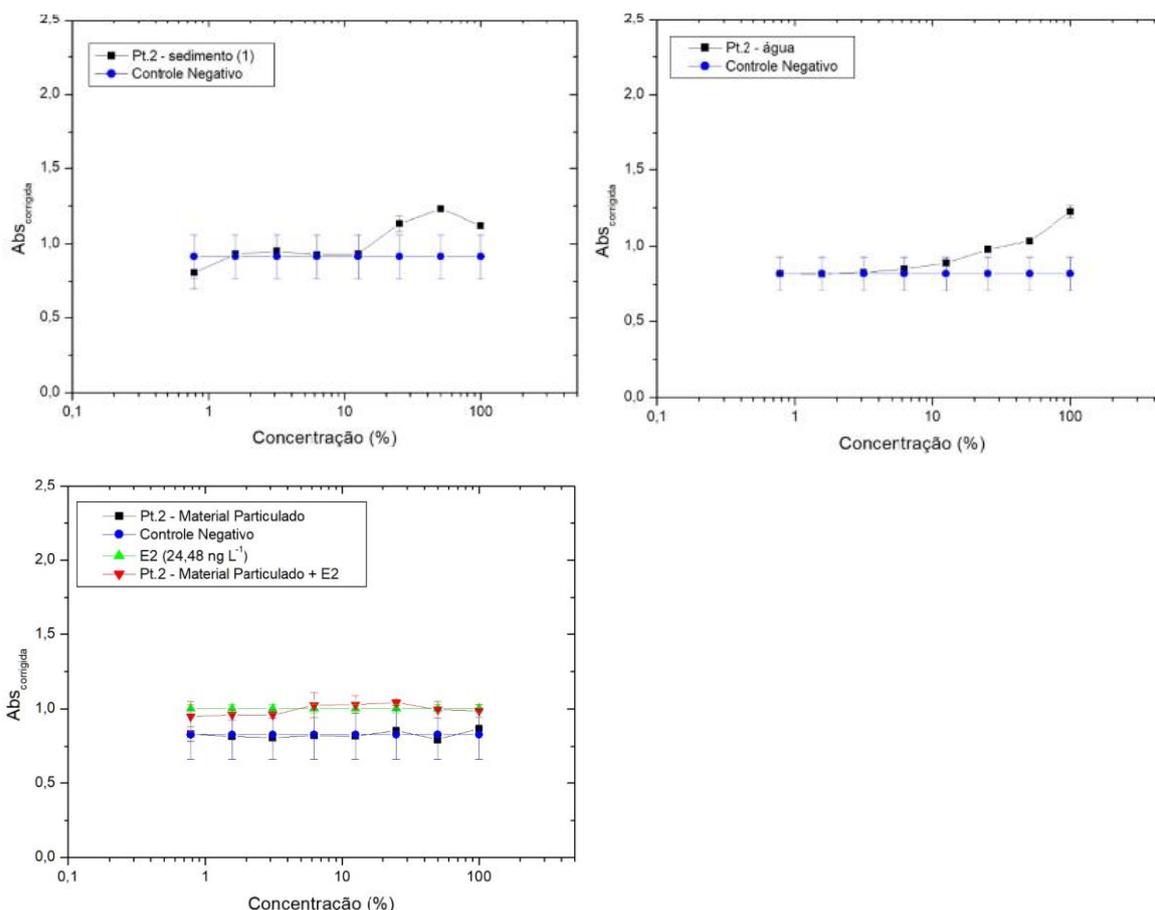
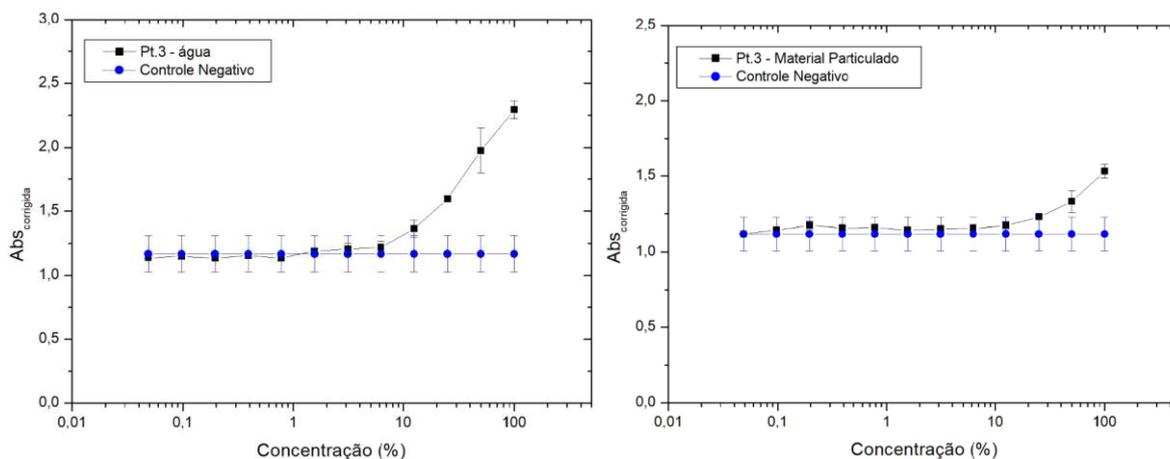


Figura 26: Curvas dose-respostas das amostras de material particulado, água superficial filtrada e sedimento e posterior medição de atividade antiestrogênica para o ponto de coleta 2, rio Grande, Ubatuba obtidas no ensaio *in vitro* YES.

Sendo assim, a análise do estuário do rio Grande apresentou atividade estrogênica quantificada em EQE2 para a fração de água superficial analisada, e detecção de compostos com comportamento antiestrogênico para a fração de sedimentos. Apesar dos diferentes mecanismos de resposta do ensaio YES e do ensaio ecotoxicológico com *V. fischeri*, podemos comparar os comportamentos das frações analisadas. No ensaio de resposta não específica, *V. fischeri*, o elutriato não apresentou inibitório para a bactéria usada no ensaio, semelhantemente, o ensaio YES para a fração de material particulado também não apresentou resposta quantitativa para atividade estrogênica. O ensaio YES é um ensaio de receptor específico com a resposta direcionada para uma única classe de compostos, enquanto o ensaio de elutriato aquoso com a bactéria retrata o cenário de ressuspensão de contaminantes e posterior centrifugação do material suspenso. Sendo assim, organismos de coluna d'água podem não ser afetados considerando apenas esse tipo de interação da matriz. No entanto, na análise dos resultados do líquido intersticial, tem-se que a resposta ecotoxicológica foi máxima, indicando assim presença de compostos tóxicos associados às frações internas do sedimento, necessitando de uma força extratora para dessorver os compostos do interstício do sedimento. O ensaio YES

para estes mesmos sedimentos, não apresentaram estrogenicidade, contudo, apresentaram efeitos antagônicos. Sugerindo assim, que estes compostos precisam também ser avaliados para definição de potenciais risco ecológicos na área de estudo.

O estuário do rio Tavares, ponto 3, apresentou valores de $5,84 \text{ ng.L}^{-1}$ de EQE2 para a amostra de água superficial, de 1 ng.L^{-1} de EQE2 para amostra de material particulado e de $0,05 \text{ ng.g}^{-1}$ para os sedimentos (Figura 27). Este estuário apresentou os sedimentos com a menor constituição orgânica dentre todos os pontos avaliados nas áreas de estudo, com valores de $0,15 \text{ mg.g}^{-1}$ para COT e $0,8\%$ de matéria orgânica. Estes são constituídos por grãos médios de areia com teor de umidade de $19,2\%$. Esta característica pode indicar que mesmo que haja o lançamento de DE neste ambiente, os sedimentos do local não têm características físico-químicas que favorecem a adsorção destes compostos no meio. Sendo assim, a poluição por DE nesta região torna-se mais favorável para a coluna d'água, uma vez que os íons presentes e o pH podem alterar a solubilidade dos compostos. Neste estudo foram avaliados apenas o Na^+ e K^+ na fração intersticial do sedimento, no entanto outros elementos podem ter maior impacto na migração dos compostos entre os compartimentos ambientais.



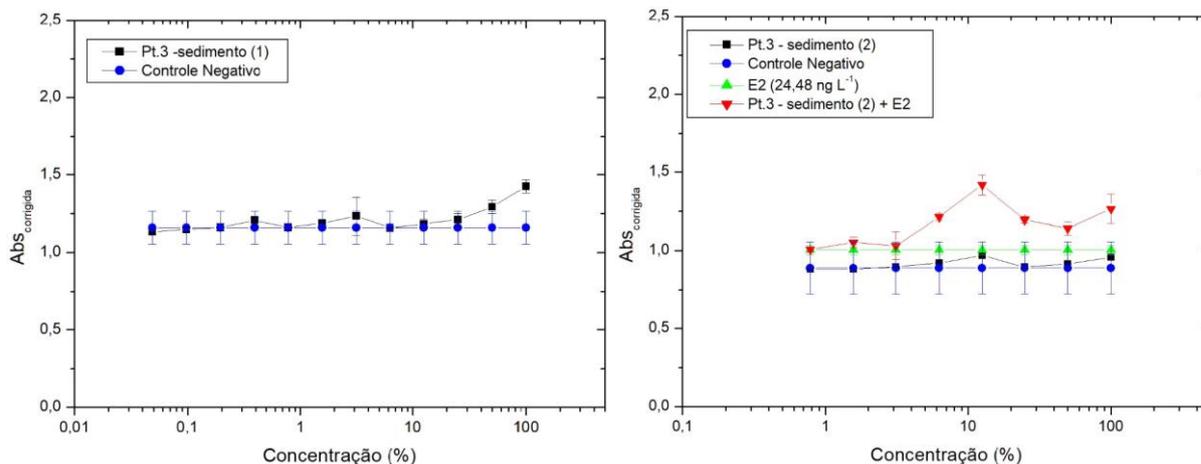


Figura 27: Curvas dose-respostas do ensaio *in vitro* YES para as amostras de material particulado, água superficial filtrada e sedimento e posterior medição de atividade antiestrogênica para o ponto de coleta 3, rio Tavares, Ubatuba.

Os resultados apresentados na Tabela 8, referentes à atividade antiestrogênica, indicam que os sedimentos dos pontos 1, 2, 3 e 5 mostraram uma potencialização do efeito do E2 nas réplicas analisadas, sugerindo a presença de desreguladores endócrinos (DE) mesmo em concentrações muito baixas. O ponto 1 apresentou um comportamento semelhante para a matriz água e material particulado, com atividade estrogênica detectável por meio do ensaio de atividade antiestrogênica. Essas evidências destacam a relevância do ensaio para identificar a contaminação por DE em sedimentos, complementando a interpretação de dados cromatográficos e permitindo uma discussão mais abrangente sobre o transporte entre matrizes ambientais, a degradação de compostos e os fatores físico-químicos que modulam essa dinâmica.

As curvas dose-respostas apresentadas na Figura 27 associadas a esses resultados evidenciam que a adição de E2 ao ensaio YES junto com os extratos das amostras possibilitou observar uma atividade estrogênica que anteriormente estava abaixo do limite de detecção do método. Isso sugere que os compostos detectados têm concentrações tão reduzidas que, sozinhos, não ativam os receptores de estrogênio, mas, quando potencializados pela adição de E2, tornam-se mensuráveis. Tal fenômeno confirma a presença de DE atuando em níveis subclínicos, destacando a sensibilidade do método aplicado.

Além disso, foi possível identificar que as amostras do ponto 3 de sedimento, ponto 2 de sedimento e ponto 1 de material particulado apresentaram antagonistas nos ensaios, o que representa um mecanismo distinto de ação dos DE. Em vez de ativarem o receptor estrogênico, esses compostos atuam bloqueando a ligação de hormônios naturais como o E2, reduzindo ou inibindo a resposta estrogênica. Essa característica reforça a complexidade da biodisponibilidade dos DE em matrizes como sedimento, água intersticial e material

particulado, uma vez que esses compostos podem se ligar a matéria orgânica, ácidos húmicos e fúlvicos ou adsorver em partículas finas, dificultando sua detecção direta e influenciando sua atividade biológica.

As amostras destas áreas de estudo foram analisadas por UPLC-MS/MS-ESI com o objetivo de identificar e quantificar desreguladores endócrinos (DE). Entretanto, devido a problemas operacionais no equipamento, não foi possível realizar as curvas de calibração necessárias para a quantificação dos compostos. Ainda assim, foi realizada a identificação de cada composto individualmente com base na similaridade dos espectros obtidos. Foi analisada a presença de picos nos respectivos tempos de retenção nos cromatogramas de cada amostra. A comparação foi feita mediante a consulta do comportamento do composto alvo na biblioteca analítica. A Tabela 9 apresenta os compostos identificados, organizados conforme seus tempos de retenção e padrões cromatográficos característicos. Os cromatogramas detalhados de cada amostra estão disponíveis no Anexo 1.

Tabela 9: Relação dos compostos identificados em cada ponto amostral a partir da identificação de similaridade de picos cromatográficos.

Composto		E1	E2	E3	EE2	BPA	4NP
Tempo		17,114	16,297	12,349	16,921	15,752	25,059
Amostra	Matriz	Pico	Pico	Pico	Pico	Pico	Pico
1	AS	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	MP	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	SED	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	SED	NO	NO	NO	NO	NO	NO
2	AS	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	MP	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	SED	NO	NO	SIM	SIM	NO	NO
	SED	NO	NO	SIM	SIM	NO	NO
3	AS	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	MP	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	SED	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	SED	NO	NO	NO	NO	NO	NO
4	AS	NO	SIM	NO	NO	NO	SIM
	MP	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	NO
	SED	SIM	NO	NO	SIM	NO	NO
	SED	SIM	SIM	NO	SIM	SIM	NO
5	AS	NO	SIM	NO	NO	NO	SIM
	MP	NO	NO	NO	SIM	NO	NO
	SED	SIM	NO	SIM	SIM	NO	NO
	SED	NO	NO	NO	NO	NO	NO

Legenda: (NO) não observado semelhança do pico cromatográfico; (SIM) similaridade no espectro/pico cromatográfico no tempo de retenção do composto; (AS) água superficial; (MP) material particulado; (SED) sedimento.

A amostra 4 apresentou a identificação de todos os compostos alvos analisados em diferentes intensidades de picos. Esse ponto de análise coincidiu como sendo o de maior valor de atividade estrogênica e como o ponto com maior indício de lançamento de efluentes segundo os ensaios realizados no presente trabalho. Nos espectros analisados do ponto 3 e do ponto 1, não foi observado padrão de similaridade para nenhum dos compostos-alvo em nenhum dos compartimentos ambientais avaliados. No entanto, alguns destes pontos apresentaram resposta positiva para desregulação endócrina pelo ensaio YES. Isto sugere que outras substâncias, não avaliadas neste estudo, são as responsáveis pela ação estrogênica nos pontos. A amostra do ponto 2 para o sedimento apresentou similaridade nos compostos E3 e EE2, apesar do EE2 ser o composto de maior potência relativa, este ponto não apresentou resposta no ensaio YES. No entanto, a análise antiestrogênica destes sedimentos apresentou resposta positiva, ressaltando a hipótese da presença de compostos antagonistas que mascaram a resposta do ensaio YES pelo bloqueio do receptor de estrogênio. Sendo assim, é necessário um aprofundamento no estudo destes compostos e das ações que ocasionam em ambientes estuarinos.

A quantificação destes compostos no ambiente pode ser correlacionado com as constantes de partição de cada um deles. Para este estudo o EE2 foi o composto mais detectado, sendo encontrado em três pontos de sedimento e dois pontos de MP. Já o E2 foi reconhecido em dois pontos de água superficial, um de MP e um de sedimento. Seguido pela avaliação da presença de E3 em dois pontos de sedimento e um de MP. O E1 e o BPA foram identificados em um ponto de MP e 1 ponto de sedimento, enquanto o 4NP foi detectado apenas em dois pontos de água superficial.

Os resultados obtidos sugerem que os pontos analisados apresentam contaminação por DE, cuja biodisponibilidade é modulada por fatores como granulometria dos sedimentos, teor de matéria orgânica, pH e a dinâmica de transporte entre sedimento, água e material particulado. Adicionalmente, a potencial biodegradação e biotransformação dos compostos no ambiente podem contribuir para a formação de metabólitos com diferentes propriedades de interação com o receptor estrogênico. A integração dos dados físico-químicos, cromatográficos e biológicos se mostra indispensável para compreender o comportamento e a dinâmica desses contaminantes emergentes em ambientes estuarinos, especialmente considerando as implicações ecológicas e de saúde pública associadas à sua presença.

Visto isso, novas metodologias para avaliação de risco ambiental, em especial os efeitos ecotoxicológicos precisam ser identificadas e definidas para garantir que as futuras legislações construam mecanismos seguros de monitoramento da qualidade da vida aquática que é um ODS. Sabendo-se que os ensaios tradicionais de ecotoxicologia não são configurados para

mecanismos específicos de via de exposição de DE, os novos modelos de ensaio precisam ao menos avaliar a relação destes compostos com os constituintes do meio ambiente, avaliando a questão do sinergismo e transporte entre camadas sedimento e água.

4.4 Respostas dos ensaios de biodisponibilidade para avaliação ecotoxicológica - Cenário 2

Nesta etapa do trabalho, foi proposta uma nova metodologia para avaliação da ecotoxicidade de DE em ambientes estuarinos. Exposições a águas intersticiais e elutriatos eliminam as vias de exposição por ingestão de sedimentos e alteram as dinâmicas naturais de sorção e dessorção. As metodologias de bioensaio utilizadas na primeira etapa do trabalho para avaliar a ecotoxicidade aguda dos extratos aquosos de sedimento apresentaram limitações. A metodologia de elutriato mascarou a real condição de degradação das áreas estudadas, enquanto o uso do líquido intersticial proporcionou uma avaliação mais representativa. No entanto, em pontos com alta concentração de matéria orgânica e íons Na^+ , o efeito tóxico não foi observado devido a expressiva emissão de bioluminescência emitido pela bactéria utilizada como organismo-teste.

Os testes tradicionais de toxicidade podem não produzir conclusões confiáveis para detectar efeitos adversos de exposições a estressores flutuantes, nutrientes, sólidos suspensos, variações de temperatura, luz ultravioleta, fluxo, mutagenicidade, carcinogenicidade, teratogenicidade, desregulação endócrina ou outras respostas subcelulares importantes. Essa limitação, combinada com o fato de que compostos com alta constante K_{ow} podem não produzir respostas de curto prazo em exposições, destaca a necessidade de ferramentas de avaliação adicionais e inovadoras para proteger os ecossistemas aquáticos. Ademais, o tempo de deposição dos contaminantes no sedimento interferem na adsorção e dessorção destes nos sedimentos, alterando a suscetibilidade de ressuspensão em eventos de bioturbação.

A incapacidade dos ensaios tradicionais de prever os efeitos deve-se, em grande parte, aos padrões complexos de resposta biológica resultantes de diferentes combinações de magnitude, duração e frequência da exposição, bem como das interações entre misturas de estressores, como os efeitos sinérgicos e antagônicos e variações de temperatura.

Com isso, a biodisponibilidade de DE foi simulada em ambientes controlados em laboratório, utilizando sedimentos e água dopados. A migração entre a interface sedimento/água foi observada, embora outras variáveis, como a dessorção, precisem ser investigadas. Estudos futuros devem avaliar, também, os efeitos aditivos e sinérgicos dos contaminantes, considerando o tempo de contato e as interfaces ambientais.

Os ensaios foram montados simultaneamente, com o mesmo lote de organismos-teste juvenis retirados do cultivo. Como os ensaios de interface foram montados um dia antes para permitir o equilíbrio entre as camadas, a idade dos organismos expostos variou em 1 dia, sendo usados organismos de 4 dias de vida no ensaio tradicional apenas com água e organismos de 5 dias nos experimentos de interface. A metodologia está descrita em 4.4.1 e os resultados observados em todos os períodos de exposição para todas as concentrações testadas estão compilados na Tabela 10.

Tabela 10: Resultados de percentual de efeito observado em todos os ensaios de biodisponibilidade proposto para avaliação da exposição direta e indireta de *M. juniae* aos DE.

	Efeito Observado (%)											
	Sedimento dopado e água do mar (SDA)				Sedimento e água do mar dopada (SAD)				Água do mar dopada (AD)			
	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Controle Negativo	0	20	20	30	0	0	20	20	0	0	0	0
Controle Positivo	10	20	20	40	10	20	20	20	0	0	0	0
C1	50	50	100	100	20	40	60	100	0	0	10	10
Mix 25%												
C2	60	60	100	100	40	40	80	100	0	0	10	20
Mix 50%												
C3	90	100	100	100	70	70	80	100	0	0	20	20
Mix 100%												

Os resultados apresentados na Tabela 10 indicaram que para o ensaio tradicional com *M. juniae* exposto diretamente a uma solução padrão preparada em laboratório, sem simulação de interações entre compartimento ambientais (representado pela sigla AD na Tabela 10), os organismos não sofreram efeito dos contaminantes. Sendo o maior efeito observado de 20% de letalidade na maior concentração testada (C3) para no maior tempo de exposição (96h).

No entanto, quando estas mesmas concentrações preparadas em água do mar foram colocadas em contato com sedimentos orgânicos lamoso da praia de Jabaquara (SAD), foi observado que os organismos foram afetados em sua totalidade (100% de efeito) na menor concentração testada (C1) para no maior tempo de exposição (96h). Este resultado sugere que a presença de DE na coluna d'água pode favorecer a dessorção de outros elementos do sedimento potencializando o efeito tóxico. Ainda, pode se supor que os produtos de biodegradação daquele ambiente ocasionaram a letalidade dos organismos. O padrão observado desperta grande incerteza quanto aos limites que vem sendo expostos na literatura como limites seguros de lançamento destes compostos. Uma vez que, os ensaios nos quais os resultados se baseiam não levam em consideração a dinâmica do ambiente.

A situação se torna ainda mais preocupante na discussão do terceiro cenário (SDA), onde a o DE já estava presente no sedimento, por meio de dopagem intencional, e depois foi

deixado em contato com água do mar natural. Os resultados expressaram que o tempo de efeito tóxico ficou mais curto. Na exposição de 24 horas, pelo menos a metade dos organismos expostos já haviam sido afetados pelas três concentrações do ensaio. Sendo assim, os fenômenos observados nesta simulação precisam ser investigados em ensaios de biodegradabilidade e dessorção de DE em sedimentos orgânicos estuarinos.

Ademais, os ensaios ecotoxicológicos propostos para avaliar a mobilidade de contaminantes entre compartimentos e suas vias de exposição indiretas e diretas aos organismos demonstraram a relevância de considerar a toxicidade dos sedimentos para organismos pelágicos. Os resultados mostraram alta letalidade dos organismos expostos a ambientes de interface de contaminação, enquanto os ensaios em coluna d'água não revelaram imobilidade significativa, conforme o formato padrão. Os parâmetros físico-químicas do tempo inicial e final de exposição estão expostos na Tabela 11.

Tabela 11: Parâmetros físico-químicos analisados no ensaio ecotoxicológico com *Mysidopsis juniae*.

Tempo de leitura	Parâmetros analisados no ensaio	Sedimento dopado e água do mar (SDA)					Sedimento e água do mar dopada (SAD)					Água do mar dopada (AD)				
		Controle Negativo	Controle Positivo	C1 Mix 25%	C2 Mix 50%	C3 Mix 100%	Controle Negativo	Controle Positivo	C1 Mix 25%	C2 Mix 50%	C3 Mix 100%	Controle Negativo	Controle Positivo	C1 Mix 25%	C2 Mix 50%	C3 Mix 100%
Inicial	pH	8,3	8,0	8,0	8,2	8,0	8,3	8,0	8,3	8,3	7,9	8,3	8,0	8,2	8,1	8,0
	Condutividade (uS.cm ⁻²)	21847	21736	21169	21874	22113	21847	21442	21416	22098	22142	21847	21658	21220	21943	22311
	Salinidade	36	37	36	37	37	36	37	36	37	37	36	37	36	37	37
	OD (mg.L ⁻¹)	8,5	7,6	7,6	7,4	7,7	7,9	7,8	8,1	8,7	7,5	8,9	8,4	8,0	8,6	7,7
	Temperatura (°C)	25,1	25,1	25,0	25,2	25,1	25,1	25,1	25,2	25,2	25,2	25,0	25,0	25,1	25,2	25,1
Final	pH	8,4	7,9	7,9	7,9	7,9	8,4	7,9	7,9	8,0	7,9	8,4	7,9	8,0	8,2	8,2
	Condutividade (uS.cm ⁻²)	26453	26447	22408	26392	26363	26453	26413	22413	26418	26379	23658	23147	23068	22971	23027
	Salinidade	43	42	40	41	42	42	42	40	42	40	37	37	37	38	38
	OD (mg.L ⁻¹)	7,8	7,0	6,0	10,9	5,9	7,8	7,3	7,8	10,4	5,2	7,9	7,5	7,4	8,0	7,4
	Temperatura (°C)	22,0	22,0	22,0	22,1	22,4	22,0	22,1	22,1	22,0	22,9	21,9	22,0	22,0	22,2	21,9

Neste trabalho os resultados dos ensaios com *V. fischeri*, *M. juniae* e os ensaio de biodisponibilidade contribuíram para esta análise sistêmica dos ambientes. Sendo assim, houve grande impacto nestes resultados em relação aos ensaios tradicionais, onde os limites considerados seguros para lançamento não expressaram a realidade da toxicidade do ambiente com presença de DE. Com isso, novas padronizações de ensaios ecotoxicológicos precisam ser amplamente estudados para garantir a determinação de faixas ambientalmente seguras de compostos DE no ambiente aquático.

Dessa forma, conclui-se que os bioensaios devem considerar novas metodologias que capazes de simular de forma mais real os efeitos ambientais, especialmente os mecanismos de migração de contaminantes entre os compartimentos ambientais. Isso deve considerar também as vias de exposição indireta dos organismos às áreas contaminadas. A utilização de organismos de diferentes níveis tróficos e comportamentos precisam ser associados para a fornecer uma avaliação mais abrangente dos riscos ambientais.

Nesse contexto, o estudo das características dos sedimentos e sua correlação com a presença de DE e seus potenciais tóxicos é crucial, diversas dessas características influenciam diretamente a adsorção de DE e outros contaminantes nesta matriz sedimentar, além de impactar sua mobilidade em ambientes aquáticos. Estudos sobre a partição e sorção de micropoluentes entre diferentes matrizes são fundamentais para compreender o comportamento ambiental desses compostos. A interação entre as fases aquosa e particulada está diretamente relacionada ao destino, aos mecanismos de transporte, dispersão e, conseqüentemente, à biodegradabilidade e biodisponibilidade dos contaminantes presentes nos sedimentos.

4.5 Transporte de contaminantes entre compartimentos no ensaio de biodisponibilidade - Cenário 2

Devido à incerteza sobre a limitação do método para avaliar a biodisponibilidade e quantificação de DE, o sedimento coletado no ponto 5, referente à praia do Jabaquara em Paraty, foi utilizado em um experimento de dopagem de matriz para posterior extração e quantificação. Para isso, foi desenvolvido um ensaio com três réplicas, considerando três diferentes interações entre compartimentos ambientais: (A) sedimento puro submetido ao método de extração UAE, seguido de EFS; (B) sedimento puro e exposto ao sobrenadante de água ultra pura (Sistema Milli-Q); (C) sedimento dopado com solução de E2 com concentração conhecida, exposto ao sobrenadante de água ultra pura (Sistema Milli-Q).

Para cada condição de interação, ao final do período de exposição, os sedimentos foram extraídos individualmente em triplicata, e uma amostra composta dos respectivos sobrenadantes foi coletada. A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos em EQ-E2 para o ensaio YES em todos os cenários avaliados. Ademais, a Tabela 12 também apresenta o efeito qualitativo observado no ensaio antiestrogênico realizado em algumas réplicas de amostras coletadas nos pontos de análise.

Tabela 12: Resultados de EQ-E2 ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) dos sedimentos com e sem dopagem e os sobrenadantes de cada ponto do ensaio preliminar de transporte de contaminantes.

PT	Réplica	EQ-E2 ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ou $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)		Citotoxicidade na diluição (%)	Limite de Detecção – LD ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ou $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)	Efeito Observado
		Média	Desvio			
A	1	0,085	0,02	0	0,047	N
	2	0,17	0,01	0	0,047	NR
	3	0,262	0,012	0	0,005	NR
B	1	0,173	0,009	0	0,005	N
	2	<LD	-	0	0,005	NR
	3	<LD	-	0	0,047	NR
C	1	0,174	0,05	0	0,005	E
	2	0,318	0,077	0	0,005	NR
	3	0,108	0,003	0	0,005	NR
Milli-Q	1	5,69	0,21	0	0,047	N
E2 sobre	1	3,58	0,009	0	0,047	E

Legenda: (-) atividade estrogênica não quantificada; (N) nenhum efeito observado; (E) atividade estrogênica observada (potencialização do efeito do 17β -estradiol adicionado); (NR) avaliação de atividade antiestrogênica não realizada.

Os resultados apresentados na Tabela 12 indicam que, para a condição (A), o maior valor observado de EQ-E2 foi $0,262\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, correspondente ao procedimento padrão de extração de sedimentos, sem dopagem prévia e sem interação do sedimento com a água. Este valor reflete a análise de background, permitindo avaliar a contaminação real do sedimento natural. Em contraste, na simulação do sedimento sem dopagem prévia, mas com a interação com a água (B), o valor obtido foi $0,173\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, evidenciando uma diminuição, o que sugere a migração do contaminante para a coluna d'água. Por fim, para o sedimento dopado com E2 e exposto à água após a dopagem ©, o valor obtido foi $0,318\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$. Para investigar a migração dos compostos, os sobrenadantes também foram extraídos e analisados. A Figura 28 apresenta a curva dose-resposta do ensaio YES para os sobrenadantes analisados.

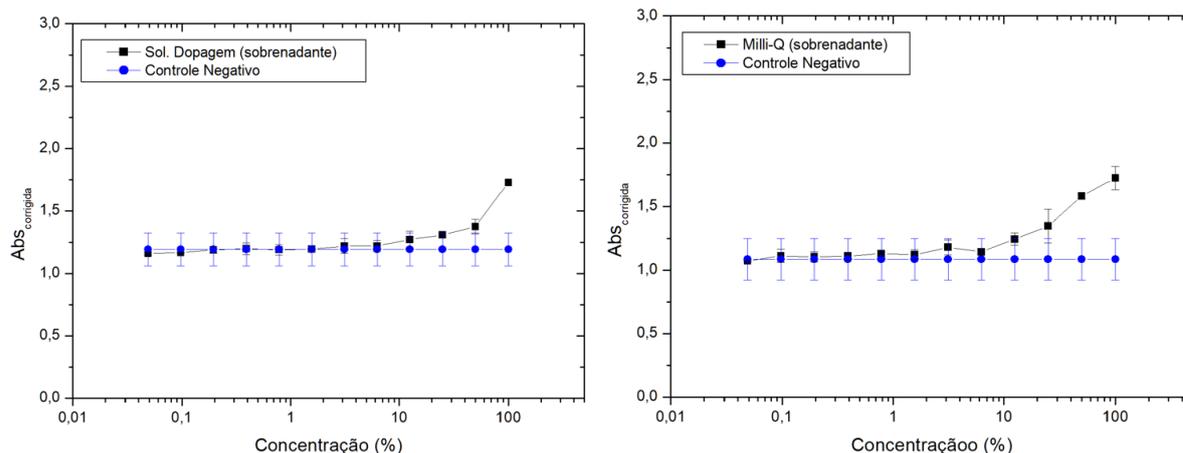


Figura 28: Curva dose-resposta dos sobrenadantes do ensaio de biodisponibilidade.

O sobrenadante com água Milli-Q apresentou uma resposta estrogênica de $5,69 \text{ ng.L}^{-1}$ EQ-E2, evidenciando que, apesar da dopagem ter sido realizada no sedimento, houve migração dos compostos para a fase aquosa. Vale ressaltar que a resposta do ensaio YES não foi capaz de assegurar qual composto presente na amostra causa o efeito estrogênico. Isso indica que, na simulação com sedimento e água, outros compostos além do dopado podem ter migrado do sedimento para a água, construindo para o aumento da resposta observada.

O sobrenadante do ensaio com dopagem de E2 apresentou valores mais baixos ($3,58 \text{ ng.L}^{-1}$ EQ-E2) quando comparado ao ensaio (B). O uso do metanol usado na dopagem do sedimento favoreceu o acúmulo do contaminante na matriz sedimentar, em vez da ressuspensão na coluna d'água, visto que o valor obtido para o sedimento (C) foi maior que o observado em (B).

Diante disso, ensaios de mistura são recomendados para avaliar o potencial aditivo e sinérgico das misturas de DE com outros contaminantes. A simulação em laboratório de amostras ambientais sempre apresenta essa limitação, pois cada ambiente contém constituintes diferentes que influenciam as respostas.

A Figura 29 apresenta a curva dose-resposta dos sedimentos do ensaio de biodisponibilidade com sedimentos previamente dopados obtidas no ensaio YES.

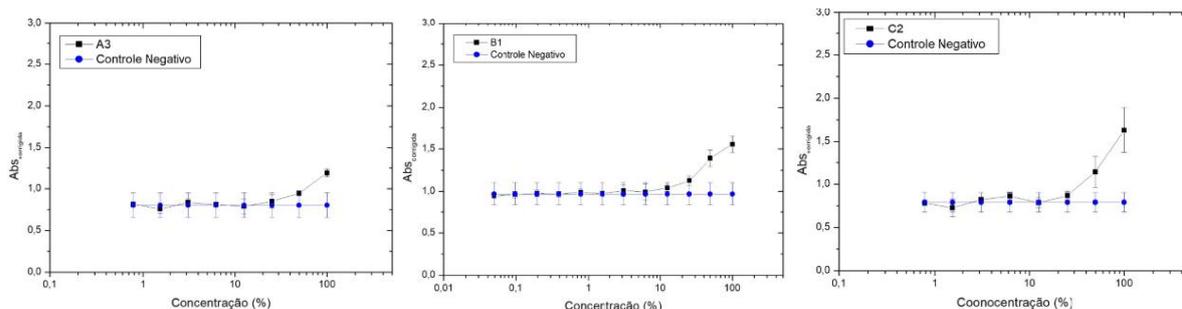


Figura 29: Curva dose-resposta dos sedimentos do ensaio de biodisponibilidade.

Considerando o exposto, é fundamental que novas abordagens para avaliação de risco sejam desenvolvidas e testadas, com o objetivo de tornar os experimentos em laboratórios mais representativos das condições ambientais reais. Essas abordagens permitirão o aprimoramento dos mecanismos de regulamentação, contribuindo para a definição de limites de lançamento de efluentes mais eficazes e adequados.

4.6 Comparativo entre os cenários avaliados e proposta de novos métodos de análise de risco e legislação

A partir das discussões sobre biodisponibilidade e transporte de contaminantes, os resultados supracitados foram compilados na Figura 30 para elucidar o cenário de contaminação por desreguladores endócrinos em seis áreas estuarinas na região Sudeste do Brasil.

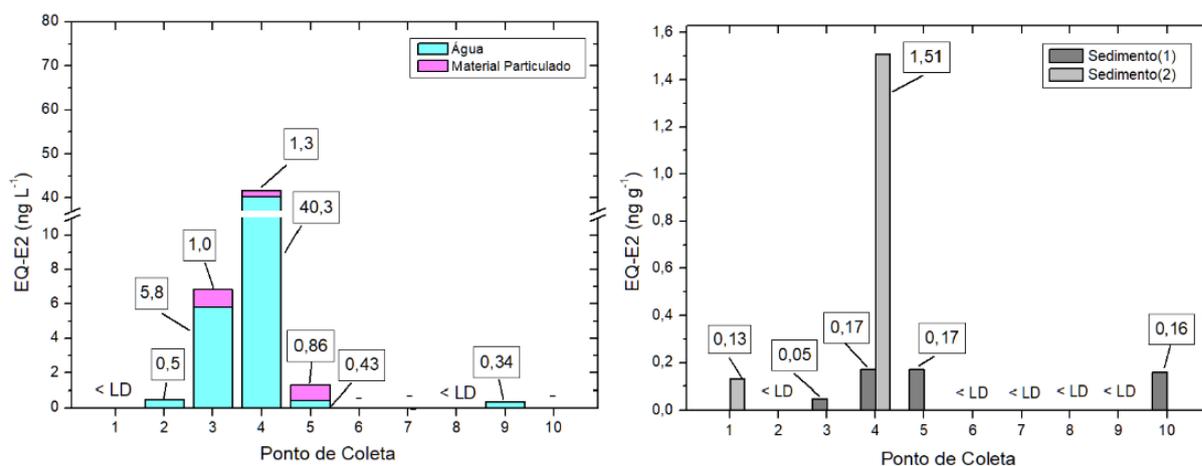


Figura 30: Gráfico com os resultados de atividade estrogênica (EQ-E2) calculados a partir do ensaio YES para todos os pontos de coleta nas áreas de estudo.

Os resultados evidenciam que o conhecimento hidrodinâmico, físico, químico e biológico da região contribui para órgãos públicos de tomada de decisão implementem políticas públicas para mitigação e remediação da contaminação por DE em ambientes estuarinos.

Os valores apresentados de atividade estrogênica na região, demonstram que os compostos migram entre camadas distintas no meio ambiente, sendo este transporte favorecido pela forma como a matéria orgânica e íons livres se comportam no meio. Sete amostras de água superficial, sete de material particulado e dez de sedimento foram analisadas quanto ao potencial de estrogenicidade, ecotoxicidade e qualitativamente identificados os DE.

Os estuários, por se tratar de um ambiente com forte dinamismo, precisa ser monitorado com ensaios integrativas que avaliem múltiplos compartimentos e simulem os efeitos sinérgicos do ambiente.

5 CONCLUSÃO

Este estudo avaliou as características físico-químicas, a ecotoxicidade e a atividade estrogênica em amostras de água, sedimento e material particulado provenientes de três municípios da região Sudeste do Brasil. Os resultados indicaram que os estuários analisados não atendem aos critérios de enquadramento na qualidade ambiental estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005) para os usos previstos, evidenciando significativo impacto antrópico e poluição decorrente do lançamento de esgoto sanitário.

Os dados demonstraram que fatores como elevados teores de matéria orgânica (DQO 16,75 mg. L⁻¹ a 46,27 mg. L⁻¹), pH alcalino (8,01 a 8,39), presença de íons (Na⁺ 18,8 ppm a 46 ppm) e substâncias húmicas (0,7 abs a 3,1 abs) aumentam a atividade estrogênica. Sendo detectados valores de 0,43 a 40,3 ng. L⁻¹ de EQE2 nas amostras de água. Além disso, a granulometria dos sedimentos influenciou na migração de contaminantes, afetando diretamente os processos de extração e a determinação do potencial estrogênico. Sedimentos com baixo teor de adsorção promoveram a migração dos DE para o material particulado. Sendo detectada atividade estrogênica na faixa de 0,86 a 1,3 ng. L⁻¹ de EQE2 para esta matriz. As amostras de sedimento apresentaram valores de 0,05 a 1,5 ng. g⁻¹ de EQE2 para esta mesma análise.

Dentre as metodologias de preparo de amostras ambientais testadas, a com uso de extração assistida por ultrassom (UAE) combinada com extração em fase sólida (EFS), que apresentou o melhor desempenho para o ensaio YES. Em matrizes mais complexas, como sedimentos, foi necessária uma etapa adicional de purificação das amostras com cartuchos SAX para a remoção de interferentes analíticos, como ácidos fúlvicos e húmicos, sendo ainda sugerido o seu uso para amostras de material particulado.

Adicionalmente, o ensaio antiestrogênico revelou a presença de substâncias antagonistas em quatro pontos de sedimento e dois de material particulado, destacando relevância para estudos mais aprofundados para fins de monitoramento ambiental. Entretanto, o bioensaio ecotoxicológico agudo aplicado aos extratos aquosos de sedimentos apresentaram limitações. Ensaio baseado em elutriatos subestimaram as condições reais de degradação dos ambientes estudados, enquanto a análise do líquido intersticial se mostrou mais representativa. Mesmo assim, em áreas com alta concentração de íons como Na⁺ e supostamente por nitritos e nitratos, a toxicidade foi mascarada pela emissão elevada de bioluminescência da bactéria utilizada como organismo-teste.

Os dados também evidenciaram que os desreguladores endócrinos (DE) identificados, incluindo E1, E2, E3, EE2, BPA e 4NP, são modulados por fatores como a presença de matéria orgânica natural (MON) e granulometria fina, especialmente em sedimentos. Esses parâmetros

afetam diretamente os processos de sorção, transporte, bioacumulação e biodisponibilidade dos DE nos ambientes estuarinos. A migração entre sedimento e água foi observada em experimentos controlados, mas variáveis como a dessorção precisam ser mais investigadas para elucidar a dinâmica de mobilidade dos contaminantes. Dentre estes compostos o EE2 foi o que foi detectado na maioria dos pontos de sedimento analisados, enquanto nas amostras de água foi o composto E2. O material particulado não apresentou um favorecimento específico de compostos, sendo observada a presença de BPA, E3, EE2, E2 e E1 em números iguais. Outros estudos levando em consideração as constantes de partição e sorção precisam ser desenvolvidas para propor medidas de monitoramento seguras para a biota e saúde pública.

Os ensaios ecotoxicológicos demonstraram a importância de integrar avaliações de mobilidade de contaminantes entre compartimentos ambientais e vias de exposição diretas e indiretas aos organismos. Os resultados revelaram elevada letalidade em organismos expostos a zonas de interface contaminada, enquanto os testes convencionais de coluna d'água subestimaram a toxicidade real dos compostos preparados em solução no laboratório. Isso reforça a necessidade de métodos integrados que considerem os efeitos sinérgicos e aditivos dos contaminantes, bem como as variações nos tempos de contato e as condições ambientais.

Por fim, este estudo destaca a relevância de caracterizar as propriedades dos sedimentos e suas correlações com a presença e os impactos tóxicos de DE. A interação entre fases aquosa e particulada influencia significativamente o destino, o transporte e a biodegradabilidade desses compostos. Compreender os processos de partição e sorção entre diferentes matrizes ambientais é essencial para avaliar os riscos ecológicos e propor estratégias mais eficazes de gestão e mitigação em ambientes estuarinos impactados.

REFERÊNCIAS

- Abbas, M., Adil, M., Ehtisham-ul-Haque, S., Munir, B., Yameen, M., Ghaffar, A., Shar, G. A., Tahir, M.A., & Iqbal, M. (2018). *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. *Science of the Total Environment*, 626, 1295–1309.
- ABESSA, D. M. de S.; BURONE, L. Toxicidade de sedimentos dos rios situados na enseada de Ubatuba (SP, Brasil). *Mundo saúde (Impr.)*, p. 564–570, 2003.
- ALLEN BURTON, G. Breaking from Tradition: Establishing More Realistic Sediment Quality Guidelines. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 4, p. 3047–3052, fev. 2018.
- Almazrouei, B., Islayem, D., Alskafi, F., Catacutan, M. K., Amna, R., Nasrat, S., ... Yildiz, I. (2023). Steroid hormones in wastewater: Sources, treatments, environmental risks, and regulations. *Emerging Contaminants*, 9(2). <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2023.100210>
- ALMEIDA, D. F. Gestão ambiental dos sedimentos de corrente do rio São Francisco na região de Três Marias/ Minas Gerais. 15 mar. 2010. Disponível em: <<https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/MAPO-88NQQC>>. Acesso em: 29 nov. 2024.
- Alves, M. C. P., Sanson, A. L., Quaresma, A. V., Freitas, M. G., Afonso, R. J. C. F., & Aquino, S. F. (2022). Occurrence and removal of drugs and endocrine disruptors in water supply systems in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais State, Brazil). *Environmental Monitoring and Assessment*, 194(7). <https://doi.org/10.1007/s10661-022-10130-8>
- AMARINGO VILLA, F. A.; MOLINA PEREZ, F. J. Evaluación toxicológica del agua y los sedimentos en el embalse La Fe, Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, v. 12, n. 1, p. 73–87, 23 dez. 2020.
- ANSELMINI, S. et al. Impact of Global Change on Environmental Hazards of Different Clays: A Case Study on *Aliivibrio Fischeri*. *Journal of Hazardous Materials*, v. 457, p. 131806, set. 2023.
- ANUMOL, T. et al. Predicting Trace Organic Compound Breakthrough in Granular Activated Carbon Using Fluorescence and UV Absorbance as Surrogates. *Water Research*, v. 76, p. 76–87, jun. 2015.
- AQUINO, S. F.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. L. **Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura**. *Eng Sanit Ambient*. 18 (3), 187-204,2013.
- ARAUJO, R. P. de A. Testes de toxicidade como instrumento na avaliação dos sedimentos de água doce do Estado de São Paulo. 2005. Universidade de São Paulo, 2005. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41134/tde-14072008-163224/>>. Acesso em: 29 nov. 2024.
- ARGOLO, A. D. S.; GOMES, G.; BILA, D. M. (Anti)Estrogenic Activity Impacted by Complex Environmental Matrices: A DOM and Multiphase Distribution Approach. *Chemosphere*, v. 310, p. 136917, jan. 2023.
- Argolo, A. dos S., Gomes, G., & Bila, D. M. (2021). Insights into total estrogenic activity in a sewage-impacted urban stream assessed via ER transcriptional activation assay: Distribution between particulate and dissolved phases. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111574. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111574>

ASSUNÇÃO, M. A. et al. Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments collected from mangroves with different levels of urbanization in southern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v. 119, n. 1, p. 439–445, 15 jun. 2017.

BABAJKO, S. et al. La sphère orale, cible et marqueur de l'exposition environnementale - I. Défaits du développement dentaire. *médecine/sciences*, v. 36, n. 3, p. 225–230, 1 mar. 2020.

Babić, S.; Pavlović, D. M. Analysis of PhACs in Solid Environmental Samples (Soil, Sediment, and Sludge). In: PETROVIC, M.; PEREZ, S.; BARCELO, D. (Ed.). *Analysis, Removal, Effects and Risk of Pharmaceuticals in the Water Cycle*. Oxford: Elsevier, 2013.

Bacia do Rio Grande de Ubatuba. Disponível em: <<https://prezi.com/6hti8kr9mf3v/bacia-do-rio-grande-de-ubatuba/>>. Acesso em: 29 nov. 2024.

BAEKELANDT, S. et al. Estetrol has a lower impact than 17 α -ethinylestradiol on the reproductive capacity of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, v. 259, p. 106505, 1 jun. 2023.

Barroso, G. C; Molisani, M. M. Pequenos estuários alimentados por pequenas bacias hidrográficas: estudo de caso dos estuários dos rios Macaé e das Ostras (RJ) IN ENGENHARIA & CIÊNCIAS AMBIENTAIS: CONTRIBUIÇÕES À GESTÃO ECOSISTÊMICA. 2019. DOI: 10.19180/978-85-99968-58-1.6

BEDÊ, Luciane Marins. Distribuição espacial, biologia populacional das espécies de braquiúros e crescimento somático de *Uca rapax* (Smith, 1870) no manguezal de Jabaquara/Paraty - RJ. 2011. 100 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2011.

BERGMANN, A. J. et al. Estrogenic, Genotoxic, and Antibacterial Effects of Chemicals from Cryogenically Milled Tire Tread. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 43, n. 9, p. 1962–1972, set. 2024.

Berlioz-Barbier, A., et. al., Multi-residue analysis of emerging pollutants in sediment using QuEChERS-based extraction followed by LC-MS/MS analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2014) 406:1259-1266

BIANCHI, T. S. *Biogeochemistry of estuaries*. Oxford ; New York: Oxford University Press, 2007.

BILA, D. M. **Degradação e Remoção da Atividade Estrogênica do Desregulador Endócrino 17 β -estradiol pelo Processo de Ozonização**. Tese de Doutorado em Ciências em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2005.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. **Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências**. *Química Nova*, v. 30, p.651-66, 2007.

BORGERT, C. J. Issue Analysis: Key Characteristics Approach for Identifying Endocrine Disruptors. *Archives of Toxicology*, v. 97, n. 10, p. 2819–2822, 1 out. 2023.

BRASIL, Resolução CONAMA n°357, de 17 de março de 2005. Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional. Publicado no D.O.U.

BUCHIANERI, V. C. Geração da série histórica de vazão por meio do modelo SMAP: subsídio para o plano de manejo da bacia do Rio Grande de Ubatuba. 2004. Universidade de São Paulo, 2004. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11150/tde-14072004-165104/>>. Acesso em: 29 nov. 2024.

BURTON, G. A.; PITT, R.; CLARK, S. The Role of Traditional and Novel Toxicity Test Methods in Assessing Stormwater and Sediment Contamination. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 30, n. 4, p. 413–447, out. 2000.

CARVALHO, A. R. M. et al. Occurrence and Analysis of Endocrine-Disrupting Compounds in a Water Supply System. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 187, n. 3, p. 139, 25 fev. 2015.

CARVALHO, C. B. de; PEREIRA, E. L.; SANTOS, A. B. dos. Mobilidade de contaminantes em solos arenosos após a aplicação de águas residuárias tratadas produzidas em indústria siderúrgica. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 26, p. 819–828, 8 nov. 2021.

CAVALCANTE, R. M. Contaminantes orgânicos em ambientes aquáticos. [s.l.] Imprensa Universitária - Universidade Federal do Ceará, 2020.

CHECA-FERNÁNDEZ, A. et al. Toxicity and Biodegradability Evaluation of HCHs-Polluted Soils after Persulfate Remediation Treatments. *Chemical Engineering Journal*, v. 482, p. 148897, fev. 2024.

CHEN, L. et al. Estrogenic Effects of Dissolved Organic Matter and Its Impact on the Activity of 17 β -Estradiol. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 19, n. 2, p. 522–528, fev. 2012.

CHOI, J. et al. Thresholds of Adversity for Endocrine Disrupting Substances: A Conceptual Case Study. *Archives of Toxicology*, v. 98, n. 7, p. 2019–2045, 1 jul. 2024.

CITULSKI, J.; FARAHBAKHS, K. Overcoming the Toxicity Effects of Municipal Wastewater Sludge and Biosolid Extracts in the Yeast Estrogen Screen (YES) Assay. *Chemosphere*, v. 87, n. 5, p. 498–503, abr. 2012.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). 2012. Protocolo para o biomonitoramento com as comunidades bentônicas de rios e reservatórios do estado de São Paulo, CETESB; Mônica Luisa Kuhlmann ... [et al.]. São Paulo: CETESB, 2012. 113 p.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). 2015a. Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo 2014, [recurso eletrônico], São Paulo: CETESB. 371p.

Considerations into the Evaluation of Contaminated Sediment Sites. CS-1. Washington,

CONSTANTINO RIOS, K. C. et al. ESTUDO DOS EFEITOS LETAIS E SUBLETAIS DO SEDIMENTO EM AMBIENTES LÓTICOS A MONTANTE E A JUSANTE DA BARRAGEM DO RIBEIRÃO JOÃO LEITE PARA CERIODAPHNIA DUBIA (CLADOCERA: CRUSTACEA) E BRANCHIURA SOWERBYI (OLIGOCHAETA: TUBIFICIDAE). Em: Educação Ambiental e Cidadania: Pesquisa e Práticas Contemporâneas - Volume 2. 1. ed. [s.l.] Editora Científica Digital, 2021. p. 146–160.

COSTA_ADMIN. Mapa da Qualidade do Rio Acaraú Instituto Costa Brasilis, 5 jul. 2018. . Disponível em: <<http://costabrasilis.org.br/noticias/mapa-da-qualidade-do-rio-acarau/>>. Acesso em: 15 nov. 2024.

COSTA_ADMIN. Monitoramento do Rio Acaraú – 16o Boletim Instituto Costa Brasilis, 7 dez. 2019. . Disponível em: <<http://costabrasilis.org.br/noticias/monitoramento-do-rio-acarau-16o-boletim/>>. Acesso em: 15 nov. 2024.

- CUKROV, N. et al. Spatial Distribution, Ecological Risk Assessment, and Source Identification of Metals in Sediments of the Krka River Estuary (Croatia). *Sustainability*, v. 16, n. 5, p. 1800, jan. 2024.
- CUNHA, D. L. et al. Occurrence of Emerging Contaminants and Analysis of Oestrogenic Activity in the Water and Sediments from Two Coastal Lagoons in South-Eastern Brazil. *Marine and Freshwater Research*, v. 72, n. 2, p. 213, 2021.
- Čvančarová, M., Křesinová, Z., & Cajthaml, T. (2013). Influence of the bioaccessible fraction of polycyclic aromatic hydrocarbons on the ecotoxicity of historically contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*, 254–255, 116–124.
- D.C.: Interstate Technology & Regulatory Council, Contaminated Sediments Team.
- DA SILVA DE FREITAS, A. et al. Multiproxy analysis in contaminated sediments from Niterói Harbour (Guanabara Bay), Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v. 175, p. 113348, 1 fev. 2022.
- DA SILVA DE FREITAS, Alex et al. Sediment Toxicity Assessment Using Marine Organism Bioassays from an Urban Coastal Lagoon (Padre Lagoon, Southeastern Brazil). *Journal of Coastal Research*, v. 40, n. 2, p. 278-288, 2024.
- DAI, X. et al. Sorption and Desorption of Sex Hormones in Soil- and Sediment-Water Systems: A Review. *Soil Ecology Letters*, v. 4, n. 1, p. 1–17, mar. 2022.
- DE LA PARRA-GUERRA, A. C.; ACEVEDO-BARRIOS, R. Studies of Endocrine Disruptors: Nonylphenol and Isomers in Biological Models. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 42, n. 7, p. 1439–1450, 2023.
- DENISE. Ensaios de toxicidade crônica com peixes, o que mudou? Disponível em: <<https://tratamentodeagua.com.br/ensaios-toxicidade-peixes/>>. Acesso em: 24 nov. 2024.
- Development of management system for emerging contaminants within the water industry. *Water Research Australia*, [s.d.]. Disponível em: <<https://www.waterra.com.au/project/development-of-management-system-for-emerging-contaminants-within-the-water-industry/>>. Acesso em: 6 nov. 2024.
- DO NASCIMENTO, M. T. L. et al. Determination of Water Quality, Toxicity and Estrogenic Activity in a Nearshore Marine Environment in Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 149, p. 197–202, mar. 2018.
- DOMÍNGUEZ, C. M. et al. Comprehensive study of acute toxicity using Microtox® bioassay in soils contaminated by lindane wastes. *Science of The Total Environment*, v. 856, p. 159146, 15 jan. 2023.
- DRADRACH, A.; SZOPKA, K.; KARCZEWSKA, A. Ecotoxicity of Pore Water in Meadow Soils Affected by Historical Spills of Arsenic-Rich Tailings. *Minerals*, v. 10, n. 9, p. 751, set. 2020.
- DYER, K. R. *Estuaries: A Physical Introduction*. [s.l.] John Wiley, 1973.
- ESTÉVEZ-DANTA, A. et al. Wastewater-based epidemiology methodology to investigate human exposure to bisphenol A, bisphenol F and bisphenol S. *Water Research*, v. 261, p. 122016, 1 set. 2024.
- Evaluation of project designs for contaminated sediment management: user guide. Gatineau QC: Environment and Climate Change Canada = Environnement et changement climatique Canada, 2022.

Extrator Acelerado por Solvente. Disponível em: <<https://www.analiticaweb.com.br/p.php?tit=extrator-acelerado-por-solvente&Bid=p547df3e721c6c>>. Acesso em: 9 nov. 2024.

Fan et al., 2019 Fan, J.; Wang, S.; Tang, J.; Zhao, J.; Wang, L.; Wang, J. Liu, S.; Li, F.; Long, S.; Yang, Y. Bioaccumulation of endocrine disrupting compounds in fish with different feeding habits along the largest subtropical river, China. *Environmental Pollution*, [S.L.], v. 247, p. 999-1008, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.113>.

FERRAZ, M. A. et al. Influence of sediment organic carbon on toxicity depends on organism's trophic ecology. *Environmental Pollution*, v. 261, p. 114134, 1 jun. 2020.

Filipkowska, A., Lubecki, L., Szymczak-Żyła, M., (...), Zamojska, A., Kowalewska, G. Anthropogenic impact on marine ecosystem health: A comparative multi-proxy investigation of recent sediments in coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, 133, pp. 328-335. 2018.

Finckh, S., Buchinger, S., Escher, B. I., Hollert, H., König, M., Krauss, M., ... Brack, W. (2022). Endocrine disrupting chemicals entering European rivers: Occurrence and adverse mixture effects in treated wastewater. *Environment International*, 170(July). <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107608>

FINOTO VIANA, L. et al. Occurrence of contaminants of emerging concern and their risks to the Pantanal Sul-Mato-Grossense aquatic biota, Brazil. *Chemosphere*, v. 337, p. 139429, 1 out. 2023.

FISCHER, F. C. et al. Mind the Exposure Gaps—Modeling Chemical Transport in Sediment Toxicity Tests. *Environmental Science & Technology*, v. 55, n. 17, p. 11885–11893, 7 set. 2021.

Froehner, S. et al. Occurrence of selected estrogens in mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin*, v. 64, n. 1, p. 75–79, 2012. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.10.021>>.

FROEHNER, S. et al. Occurrence of Sexual Hormones in Sediments of Mangrove in Brazil. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 219, n. 1–4, p. 591–599, jul. 2011.

FUCHSMAN, P.; FETTERS, K.; O'CONNOR, A. Target Lipid Model and Empirical Organic Carbon Partition Coefficients Predict Sediment Toxicity of Polychlorinated Biphenyls to Benthic Invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 42, n. 5, p. 1134–1151, maio 2023.

GEA, M. et al. Estrogenic Activity in Wastewater Treatment Plants through in Vitro Effect-Based Assays: Insights into Extraction Phase. *Journal of Environmental Management*, v. 354, p. 120412, mar. 2024.

GEOSSORVENTES. Em: CAVALCANTE, R. M. (Ed.). *Contaminantes orgânicos em ambientes aquáticos*. [s.l.] Imprensa Universitária - Universidade Federal do Ceará, 2020. p. 50.

GHOSH, P.; MUKHERJI, S. Bioluminescence Inhibition Assay for Toxicity Measurement of PAHs and Heterocyclic PAHs. Em: GOEL, S. (Ed.). *Advances in Solid and Hazardous Waste Management*. Cham: Springer International Publishing, 2024. p. 107–118.

Giamaki, D., Tsiotsiou, M., Oglou, S. C., & Touraki, M. (2023). Interactions of Bisphenol A with *Artemia franciscana* and the ameliorative effect of probiotics. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 98(September 2022), 104064. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2023.104064>

GOMES, G. et al. Interferences in the Yeast Estrogen Screen (YES) Assay for Evaluation of Estrogenicity in Environmental Samples, Chemical Mixtures, and Individual Substances. *Toxicology in Vitro*, v. 88, p. 105551, abr. 2023.

Gomes, G.; Argolo, A.S.; Felix, L.C.; Bila, D.M. Interferences in the yeast estrogen screen (YES) assay for evaluation of estrogenicity in environmental samples, chemical mixtures, and individual substances. *Toxicology in vitro*, v. 38, April 2023, p. 105551, 2023

Gonzalez-Merchan, C., Perrodin, Y., Sébastian, C., Bazin, C., Winiarski, T., & Barraud, S. (2014). Ecotoxicological characterisation of sediments from stormwater retention basins. *Water Science and Technology*, 69(5), 1045–1051.

GRIFFERO, L. et al. Estrogenicity and cytotoxicity of sediments and water from the drinkwater source-basin of Montevideo city, Uruguay. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, v. 13, n. 1, p. 15–22, 14 maio 2024.

HARKEY, G. A.; LANDRUM, P. F.; KLAINE, S. J. COMPARISON OF WHOLE-SEDIMENT, ELUTRIATE AND PORE-WATER EXPOSURES FOR USE IN ASSESSING SEDIMENT-ASSOCIATED ORGANIC CONTAMINANTS IN BIOASSAYS. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 13, n. 8, p. 1315, 1994.

HU, B. et al. Sediment and interstitial water heavy metals in mangrove restoration wetland and preliminary exploration of microplastics in interstitial water. *CATENA*, v. 221, p. 106764, 1 fev. 2023.

HWANG, K. et al. Large-Scale Sediment Toxicity Assessment over the 15,000 Km of Coastline in the Yellow and Bohai Seas, East Asia. *Science of The Total Environment*, v. 792, p. 148371, out. 2021.

ITRC (Interstate Technology & Regulatory Council). 2011. Incorporating Bioavailability. < >

IUELE, H.; BUCCIARELLI, A.; LING, N. Novel Hyphenation of DGT In-Situ Passive Sampling with YES Assay to Ascertain the Potency of Emerging Endocrine Disruptors in Water Systems in New Zealand. *Water Research*, v. 219, p. 118567, jul. 2022.

Jan, R., Roy, R., Yadav, S., & Satsangi, P. G. (2018). Chemical fractionation and health risk assessment of particulate matter-bound metals in Pune, India. *Environmental Geochemistry and Health*, 40, 255–270.

Jarque, S., Masner, P., Klánová, J., Prokeš, R., & Bláha, L. (2016). Bioluminescent *Vibrio fischeri* Assays in the Assessment of Seasonal and Spatial Patterns in Toxicity of Contaminated River Sediments. *Frontiers in. Microbiology*, 7, 1738.

JUNIOR, H. G.; OLIVATO, D.; SOUZA, I. de. A IMPORTÂNCIA DO ORDENAMENTO TERRITORIAL E DA PARTICIPAÇÃO SOCIAL PARA A GESTÃO DE ÁREAS COSTEIRAS: ESTUDO DE CASO NA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO INDAIÁ – UBATUBA (SP). *OLAM: Ciência & Tecnologia*, v. 13, n. 1, 29 ago. 2013. Disponível em: <<https://www.periodicos.rc.biblioteca.unesp.br/index.php/olam/article/view/7563>>. Acesso em: 29 nov. 2024.

Khan, H. K.; Rehman, M. Y. A.; Malik, R. N. Fate and toxicity of pharmaceuticals in water environment: An insight on their occurrence in South Asia. *Journal of Environmental Management*, v. 271, n. March, p. 111030, 2020. <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111030>>.

KHAN, K.; ROY, K. Chemometric Modeling of Toxicity of Chemicals to Marine Bacteria. Em: *Chemometrics and Cheminformatics in Aquatic Toxicology*. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2021. p. 359–376.

KILCOYNE, K. R.; MITCHELL, R. T. Effect of environmental and pharmaceutical exposures on fetal testis development and function: a systematic review of human experimental data. *Human Reproduction Update*, v. 25, n. 4, p. 397–421, 1 jul. 2019.

KIM, N. Y.; LOGANATHAN, B. G.; KIM, G. B. Assessment of toxicity potential of freely dissolved PAHs using passive sampler in Kentucky Lake and Ohio River. *Marine Pollution Bulletin*, v. 207, p. 116833, 1 out. 2024.

Klančič, V., Gobec, M., & Jakopin, Ž. (2022). Environmental contamination status with common ingredients of household and personal care products exhibiting endocrine-disrupting potential. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(49), 73648–73674. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22895-z>

KOVÁTS, N. et al. Ecotoxicity Testing of Airborne Particulate Matter—Comparison of Sample Preparation Techniques for the *Vibrio Fischeri* Assay. *Environmental Geochemistry and Health*, v. 43, n. 11, p. 4367–4378, 1 nov. 2021.

KUHLMANN, M. L.; CETESB, S. P. Protocolo para o biomonitoramento com as comunidades bentônicas de rios e reservatórios do estado de São Paulo. 2012. Disponível em: <https://repositorio.cetesb.sp.gov.br/items/041510_Protocolo-biomonitoramento-2012.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2024.

Laboratório da CETESB usa biosensores para detectar hormônios em águas» CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. , 22 out. 2012. . Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/blog/2012/10/22/laboratorio-da-cetesb-usa-biosensores-para-detectar-hormonios-em-aguas/>>. Acesso em: 1 nov. 2024.

LACOUTURE, A. et al. Estrogens and endocrine-disrupting chemicals differentially impact the bioenergetic fluxes of mammary epithelial cells in two- and three-dimensional models. *Environment International*, v. 179, p. 108132, 1 set. 2023.

Large-scale sediment toxicity assessment over the 15,000 km of coastline in the Yellow and Bohai seas, East Asia - ScienceDirect. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969721034422?casa_token=F_3ekaWTY2EAAAAA:IHqhlooV7RmEKEkd56ekcmZeHwCPW9AXobHddUpvQVXmS81zCOPHNp4i8hwoGeGy4FKkULceeS4>. Acesso em: 29 nov. 2024.

LEAL, P. C. B. Mapeamento de perigo de escorregamento na bacia hidrográfica do Rio Grande de Ubatuba - Ubatuba (SP): comparação dos métodos analítico e sintético. 2014. Universidade de São Paulo, 2014. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/8/8135/tde-11062015-155431/>>. Acesso em: 29 nov. 2024.

LEBLANC, G. A. Overview of Endocrine Disruptor Ecotoxicity in Wildlife. Em: *Endocrine Toxicology*. 3. ed. [s.l.] CRC Press, 2010.

Leitgib, L., Kálmán, J., & Gruiz, K. (2007). Comparison of bioassays by testing whole soil and their water extract from contaminated sites. *Chemosphere*, 66, 428–434.

LEÓN, V. M. et al. Identification of contaminants of emerging concern with potential environmental risk in Spanish continental shelf sediments. *Science of The Total Environment*, v. 742, p. 140505, 10 nov. 2020.

LEUSCH, F. D. L. et al. Analysis of endocrine activity in drinking water, surface water and treated wastewater from six countries. *Water Research*, v. 139, p. 10–18, 1 ago. 2018.

LI, Y. et al. Recent Advances in the Development and Applications of Luminescent Bacteria-Based Biosensors. *Luminescence*, v. 39, n. 3, p. e4721, mar. 2024.

LIU, A. et al. Using Chemical and Biological Data to Predict Drug Toxicity. *SLAS Discovery*, v. 28, n. 3, p. 53–64, abr. 2023.

Liu, S., Xu, R., Pan, Y. F., Huang, Q. Y., Wu, N. N., Li, H. X., ... Xu, X. R. (2023). Free and conjugated forms of metabolites are indispensable components of steroids: The first evidence from an estuarine food web. *Water Research*, 235(February). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119913>

MAI, S. et al. The long-term effects of norgestrel on the reproductive and thyroid systems in adult zebrafish at environmentally relevant concentrations. *Aquatic Toxicology*, v. 276, p. 107105, 1 nov. 2024.

MARIANA, M. et al. Adverse cardiovascular effects of long-term exposure to diethyl phthalate in the rat aorta. *Chemosphere*, v. 340, p. 139904, 1 nov. 2023.

MARTY, M. S. et al. Population-Relevant Endpoints in the Evaluation of Endocrine-Active Substances (EAS) for Ecotoxicological Hazard and Risk Assessment. *Integrated Environmental Assessment and Management*, v. 13, n. 2, p. 317–330, 2017.

MAUAD, C.R.; WAGENER, A.L.R.; MASSONE, C.G.; ANICETO, M.S.; LAZZARI, L.; CARREIRA, R.S.; FARIAS, C.O. Urban Rivers as conveyors of hydrocarbons to sediments of estuarine areas: Source characterization, flow rates and mass accumulation. *Science of the Total Environment*, v.506-507, p. 656-666, 2015.

MEAKIN, C.; BARRETT, E. S.; ALEKSUNES, L. M. Extravillous trophoblast migration and invasion: Impact of environmental chemicals and pharmaceuticals. *Reproductive Toxicology*, v. 107, p. 60–68, 1 jan. 2022.

MEHINTO, A. C. et al. Bioanalytical and Non-Targeted Mass Spectrometric Screening for Contaminants of Emerging Concern in Southern California Bight Sediments. *Chemosphere*, v. 331, p. 138789, ago. 2023.

MEHLER, W. T. et al. Comparative Analysis of Whole Sediment and Porewater Toxicity Identification Evaluation Techniques for Ammonia and Non-Polar Organic Contaminants. *Chemosphere*, v. 78, n. 7, p. 814–821, fev. 2010.

Molisani, M.M., Costa, R.N., Cunha, P. et al. Acute Toxicity Bioassay with the Amphipod, *Grandidierella bonnieroides* S. After Exposure to Sediments from an Urban Estuary (Macaé River Estuary, RJ, Brazil). *Bull Environ Contam Toxicol* 90, 79–84 (2013). <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0871-9>

Monitoramento do Rio Acaraú - Instituto Costa Brasilis. Disponível em: <<https://www.google.com/maps/d/viewer?mid=10vnfLERCqcsCCfy6IGQkyvfNzc0vd8K7C>>. Acesso em: 29 nov. 2024.

Moreira CG, Santos HG, Bila DM, Fonseca FV (2021) Assessment of fouling mechanisms on reverse osmosis (RO) membrane during permeation of 17 α -ethinylestradiol (EE2) solutions. *Enviro Technol* 43:1–13. <https://doi.org/10.1080/09593330.2021.1916>

MUSEU NACIONAL (ed.). Avaliação ambiental de estuários brasileiros: diretrizes metodológicas. Rio de Janeiro: Museu nacional, 2006.

Nagelkerken I, Van der Velde G, Gorissen MW, Meijer GJ, Van't HoFT, Den Hartog C. 2000. Importance of mangroves, seagrass beds and the shallow coral reef as a nursery for important coral reef fishes, using a visual census technique. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 51: 31–44.

NEALE, P. A. et al. ECHIDNA (Emerging CHEMicals Database for National Awareness): a framework to prioritise contaminants of emerging concern in water. *Journal of Water and Health*, v. 21, n. 9, p. 1357–1368, 11 set. 2023.

NICHOLAS, K. Emerging chemicals database | Free access extended Water Research Australia, 27 set. 2022. Disponível em: <<https://www.waterra.com.au/emerging-chemicals-database-free-access-extended/>>. Acesso em: 6 nov. 2024.

Nieto, E. et al. Effects of exposure to pharmaceuticals (diclofenac and carbamazepine) spiked sediments in the midge, *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). *Science of the Total Environment*, v. 609, p. 715–723, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.171>>.

OECD (2018), Revised Guidance Document 150 on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, OECD Series on Testing and Assessment, No. 150, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264304741-en>.

OECD (2024), Validation report for the Test Guideline on Short-term Juvenile Hormone Activity Screening Assay using *Daphnia magna* (JHASA), OECD Series on Testing and Assessment, No. 395, OECD Publishing, Paris.

Palma, P., Ledo, L., Soares, S., Barbosa, I. R., & Alvarenga, P. (2014). Integrated environmental assessment of freshwater sediments: A chemical and ecotoxicological approach at the Alqueva reservoir. *Environmental Geochemistry and Health*, 36, 209–223.

Paulovits, G., Kováts, N., Ács, A., Ferincz, Á., Kovács, A., Kakasi, B., Nagy, Sz., & Kiss, G. (2012). Ecotoxicological characterisation of sedimentation in the Kis-Balaton Water Protection System. *Acta Biologica Hungarica*, 63, 268–276.

PELLETIER, M. Sediment quality status of Lake Saint-Pierre in 2013. Quebec, Quebec: St. Lawrence Action Plan 2011-2026, 2018.

PIÑA, S. et al. Fast simultaneous electrochemical detection of Bisphenol-A and Bisphenol-S in urban wastewater using a graphene oxide-iron nanoparticles hybrid sensor. *Electrochimica Acta*, v. 468, p. 143164, 10 nov. 2023.

PRINCIPAL RESEARCH SCIENTIST, MARINE ECO-TECHNOLOGY INSTITUTE, BUSAN 48520, KOREA et al. Biological Toxicity Assessment of Sediment at an Ocean Dumping Site in Korea. *Journal of the Korean Society of Marine Environment and Safety*, v. 28, n. 1, p. 1–9, 28 fev. 2022.

Prioste, M. A. O. Bacia Hidrográfica do rio das Ostras: proposta para gestão ambiental sustentável. 2007. 193 p. Dissertação (Mestrado) - PEAMB/UERJ, Rio de Janeiro, 2007

Pritchard, D. Salinity distribution and circulation in the Chesapeake Bay estuarine system. *Journal of Marine Research*, v.11, n.1, p. 106-123, 1952.

PROSPERI, V. A. Comparação de métodos ecotoxicológicos na avaliação de sedimentos marinhos e estuarinos. 2016. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18139/tde-10062016-155315/>>. Acesso em: 29 nov. 2024.

Puri, M; Gandhi, K.; Suresh Kumar, M. Emerging environmental contaminants: A global perspective on policies and regulations, *Journal of Environmental Management*, Volume 332, 2023, 117344, ISSN 0301-4797. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117344>

Qualidade do rio Indaiá é aceitável. Cuidágua Indaiá, 13 nov. 2009. . Disponível em: <<https://cuidagua.wordpress.com/noticias/qualidade-do-rio-indaia-e-aceitavel/>>. Acesso em: 15 nov. 2024.

REIS, R. et al. Electrochemical degradation of 17 α -ethinylestradiol: Transformation products, degradation pathways and in vivo assessment of estrogenic activity. *Environment International*, v. 176, p. 107992, 1 jun. 2023.

RIBA, I.; LUQUE-ESCALONA, A.; COSTA, M. H. Sediment Contamination and Toxicity in the Guadalquivir River (Southwest, Spain). *Applied Sciences*, v. 13, n. 6, p. 3585, 10 mar. 2023.

Rio das Ostras, Prefeitura Municipal. Diagnóstico Ambiental da Bacia Hidrográfica do Rio das Ostras. 2004. 147 p

ROMANO, S. et al. Ecotoxicity, genotoxicity, and oxidative potential tests of atmospheric PM10 particles. *Atmospheric Environment*, v. 221, p. 117085, 15 jan. 2020.

Romano, S., Perrone, M. R., Becagli, S., Pietrogrande, M. C., Russo, M., Caricato, R., & Lionetto, M. G. (2020). Ecotoxicity, genotoxicity, and oxidative potential tests of atmospheric PM10 particles. *Atmospheric Environment*, 221, 117085.

SABINO, J. A. et al. Occurrence of Organic Micropollutants in an Urbanized Sub-Basin and Ecological Risk Assessment. *Ecotoxicology*, v. 30, n. 1, p. 130–141, jan. 2021.

SABIR, S.; AKHTAR, M. F.; SALEEM, A. Endocrine Disruption as an Adverse Effect of Non-Endocrine Targeting Pharmaceuticals. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 26, n. 2, p. 1277–1286, 1 jan. 2019.

SAH, D. et al. Chemical Fractionation of Heavy Metals in Fine Particulate Matter and Their Health Risk Assessment through Inhalation Exposure Pathway. *Environmental Geochemistry and Health*, v. 41, n. 3, p. 1445–1458, 1 jun. 2019.

Sah, D., Verma, P. K., Kumari, K. M., & Lakhani, A. (2019). Chemical fractionation of heavy metals in fine particulate matter and their health risk assessment through inhalation exposure pathway. *Environmental Geochemistry and Health*, 41, 1445–1458.

Sangster, J.L., Oke, H., Zhang, Y., Bartelt-Hunt, S.L. The effect of particle size on sorption of estrogens, androgens and progestagens in aquatic sediment. *Journal of Hazardous Materials* Volume 299, Pages 112 - 121 December 05, 2015.

Sangster, J.L.; Ali, J.M.; Snow, D.D.; Kolok, A.S.; Bartelt-Hunt, S.L. Bioavailability and Fate of Sediment-Associated Progesterone in Aquatic Systems. *Environmental Science and Technology*, 50(7), pp. 4027–4036. 2016

SANTANA-VIERA, S. et al. Analysis of Psychoactive Substances and Metabolites in Sludges, Soils, Sediments and Biota: A Review. *Environmental Chemistry Letters*, v. 21, n. 4, p. 2311–2335, ago. 2023.

SANTORE, R. C. et al. Refining Our Understanding of Metal Bioavailability in Sediments Using Information from Porewater: Application of a Multimetal Biotic Ligand Model as an Extension of the Equilibrium Partitioning Sediment Benchmarks. *Integrated Environmental Assessment and Management*, v. 18, n. 5, p. 1335–1347, 2022.

SANTOS ET AL. Estudos preliminares para avaliar a qualidade ambiental do Rio Acaraú em Ubatuba (São Paulo, Brasil): Caique Pacheco dos Santos, Judith Font Batalla. *Unisanta BioScience*, v. 6, n. 4, 2017. Disponível em: <<https://periodicos.unisanta.br/BIO/article/view/354>>. Acesso em: 15 nov. 2024.

SANTOS, A. D. D. O. et al. Estrogenic Activity and Acute Toxicity Assessments of Sediments from a Chronically Polluted Estuarine Area in Southeastern Brazil. *Environmental Quality Management*, v. 33, n. 3, p. 183–194, mar. 2024.

Sardina, P. et al. Emerging and legacy contaminants across land-use gradients and the risk to aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment*, v. 695, p. 133842, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133842>>.

Schönfelder, G., Wittfoht, W., Hopp, H., Talsness, C. E., Paul, M., & Chahoud, I. (2002). Parent bisphenol an accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environmental Health Perspectives*, 110(11), 703–707. <https://doi.org/10.1289/ehp.110-1241091>

Sediment Contamination and Toxicity in the Guadalquivir River (Southwest, Spain). Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-3417/13/6/3585>>. Acesso em: 29 nov. 2024.

SELIVANOVSKAYA, S. et al. A Comparison of Microbial Contact Bioassay with Conventional Elutriate Assays for Evaluation of Wastes Hazard. *International Journal of Environment and Waste Management*, v. 6, n. 1/2, p. 183, 2010.

Selivanovskaya, S., Galitskaya, P., Schnell, S., & Hung, Y.-T. (2010). A comparison of microbial contact bioassay with conventional elutriate assays for evaluation of wastes hazard. *International Journal of Environment and Waste Management*, 6(1/2), 183–196.

SGROI, M. et al. Modeling Emerging Contaminants Breakthrough in Packed Bed Adsorption Columns by UV Absorbance and Fluorescing Components of Dissolved Organic Matter. *Water Research*, v. 145, p. 667–677, nov. 2018.

SILVA, L. G. R. et al. LED Irradiated Photo-Fenton for the Removal of Estrogenic Activity and Endocrine Disruptors from Wastewater Treatment Plant Effluent. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 28, n. 19, p. 24067–24078, maio 2021.

SILVA, L. Rio seca de forma impressionante e assusta moradores, em Ubatuba (SP). Disponível em: <<https://costanorte.com.br/meio-ambiente/rio-seca-de-forma-impressionante-e-assusta-moradores-em-ubatuba-sp.html>>. Acesso em: 15 nov. 2024.

Snow, D; Cassada, D.; Bartelt–Hunt, S. L.; Li, X.; D’Alessio, M.; Levine, R.; Zhang, Y. and Sallach, J. B. Detection, Occurrence and Fate of Emerging Contaminants in Agricultural Environments. *Water Environment Research*, Volume 87, Number 10. 2015 Water Environment Federation

State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789241505031>>. Acesso em: 31 out. 2024.

Stommel, H. Recent Development in the Study of Tidal Estuaries. Tech. Rept. Massachusetts: Woods Hole Oceanographic Institution, 1951. 18 p. n. 51-33. 17

SYCHROVÁ, E. et al. In vitro testicular toxicity of environmentally relevant endocrine-disrupting chemicals: 2D vs. 3D models of prepubertal Leydig TM3 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 93, p. 103869, 1 jul. 2022.

Takeuchi T, Tsutsumi O. 2002. Serum bisphenol A concentrations showed gender differences, possibly linked to andro-gen levels. *Biochem Biophys Res Commun* 291:76–78.

Tan, X., Jin, Q., Lu, J., Zhao, B., Gou, W., Yang, R., ... Zhang, L. (2022). Development and Validation of a Modified QuEChERS Method for the Analysis of Bisphenols in Meats by UPLC-MS/MS. *Chromatographia*, 85(5), 433–445. <https://doi.org/10.1007/s10337-022-04149-9>

The Role of Traditional and Novel Toxicity Test Methods in Assessing Stormwater and Sediment Contamination. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/10643380091184228?needAccess=true>>. Acesso em: 26 nov. 2024.

Tišler, T. et al. Hazard identification and risk characterization of bisphenols A, F and AF to aquatic organisms. *Environmental Pollution*, v. 212, p. 472–479, 2016.

US EPA, 2001. Methods for Collection, Storage and Manipulation of Sediments for Chemical and Toxicological Analyses: Technical Manual. Disponível em: <<http://nepis.epa.gov/>>

Varshney, P., Saini, R., & Taneja, A. (2016). Trace element concentration in fine particulate matter (PM_{2.5}) and their bioavailability in different microenvironments in Agra, India: A case study. *Environmental Geochemistry and Health*, 38(2), 593–605.

Verma, V., Rico-Martinez, R., Kotra, N., King, L., Liu, J., Snell, T. W., & Weber, R. J. (2012). Contribution of water-soluble and insoluble components and their hydrophobic/hydrophilic subfractions to the reactive oxygen species-generating potential of fine ambient aerosols. *Environmental Science and Technology*, 46, 11384–11392.

Verma, V., Rico-Martinez, R., Kotra, N., Rennolds, C., Liu, J., Snell, T. W., & Weber, R. J. (2013). Estimating the toxicity of ambient fine aerosols using freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* (Rotifera: Monogononta). *Environmental Pollution*, 182, 379–384.

VESELI, M. et al. Bioaccumulation and bioamplification of pharmaceuticals and endocrine disruptors in aquatic insects. *Science of The Total Environment*, v. 838, p. 156208, 10 set. 2022.

Vosges, M. et al. 17 α -Ethinylestradiol disrupts the ontogeny of the forebrain GnRH system and the expression of brain aromatase during early development of zebrafish. *Aquatic Toxicology*, v. 99, n. 4, p. 479–491, set. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X10002365>>.

WAGNER, M. et al. Endocrine Disruption and In Vitro Ecotoxicology: Recent Advances and Approaches. Em: REIFFERSCHIED, G.; BUCHINGER, S. (Ed.). *In vitro Environmental Toxicology - Concepts, Application and Assessment*. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 1–58.

Wan, Y. ping, Chai, B. wen, Wei, Q., Hayat, W., Dang, Z., & Liu, Z. hua. (2022). 17 α -ethinylestradiol and its two main conjugates in seven municipal wastewater treatment plants: Analytical method, their occurrence, removal and risk evaluation. *Science of the Total Environment*, 812, 152489. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152489>

WANG, L.-H.; CHEN, L.-R.; CHEN, K.-H. In Vitro and Vivo Identification, Metabolism and Action of Xenoestrogens: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 8, p. 4013, 13 abr. 2021.

WANG, W. et al. Toxicity of Substituted P-Phenylenediamine Antioxidants and Their Derived Novel Quinones on Aquatic Bacterium: Acute Effects and Mechanistic Insights. *Journal of Hazardous Materials*, v. 469, p. 133900, maio 2024.

WEI, F. et al. Parabens as Chemicals of Emerging Concern in the Environment and Humans: A Review. *Science of The Total Environment*, v. 778, p. 146150, jul. 2021.

Wei, F., Mortimer, M., Cheng, H., Sang, N., & Guo, L. H. (2021). Parabens as chemicals of emerging concern in the environment and humans: A review. *Science of the Total Environment*, 778, 146150. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146150>

WILKINSON, J. L. et al. Pharmaceutical Pollution of the World's Rivers. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 119, n. 8, p. e2113947119, 22 fev. 2022.

WU, Z. et al. Insights into the impacts of bioturbation by multiple benthic organisms on the bioavailability and toxic effects of perfluorooctane sulfonate in sediment. Journal of Hazardous Materials, v. 420, p. 126675, 15 out. 2021.

YÁÑEZ-ARANCIBIA ET AL., 1993

ZHANG, K. et al. Application of Luminescent Bacteria Bioassay in the Detection of Pollutants in Soil. Sustainability, v. 15, n. 9, p. 7351, 28 abr. 2023.

Zhang, Y.; Sangster, J.L.; Gauza, L.; Bartelt-Hunt, S.L. Impact of sediment particle size on biotransformation of 17 β -estradiol and 17 β -trenbolone. Science of the Total Environment, 572, pp. 207–215. 2016.

ZHAO, L. et al. Assessment of occurrence, partitioning and ecological risk for 144 steroid hormones in Taihu Lake using UPLC-MS/MS with machine learning model. Chemosphere, v. 354, p. 141598, 1 abr. 2024.

ZHU, Q. et al. Bioavailability Assessment of Heavy Metals and Organic Pollutants in Water and Soil Using DGT: A Review. Applied Sciences, v. 13, n. 17, p. 9760, 29 ago. 2023.

ANEXO 1 – LC-MS/MS-ESI – Espectro de Massas

CLAE-DAD-ELSD: cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo 1200 infinity series do fabricante Agilent Technologies. O equipamento é formado pelos seguintes módulos: Degaseificador (1260 HIP degasser G4225A), bomba de dois canais (1260 bin pump G1312B), amostrador automático (1260 ALS G1329B), compartimento de coluna (1260 TCC G1316A), detector de ultravioleta por arranjo de diodos (1260 DAD G4212B) e detector de espalhamento de luz (1260 ELSD G4260 B).

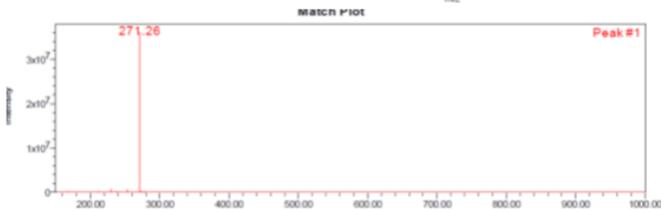
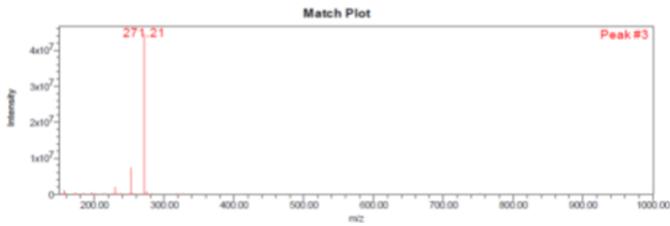
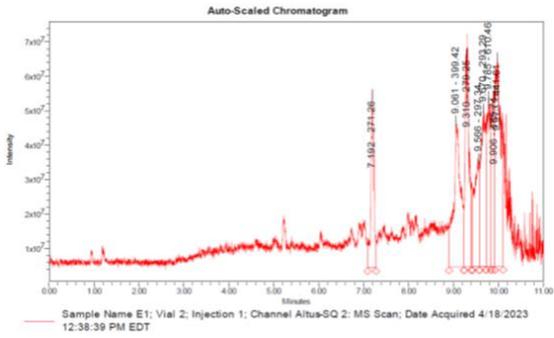
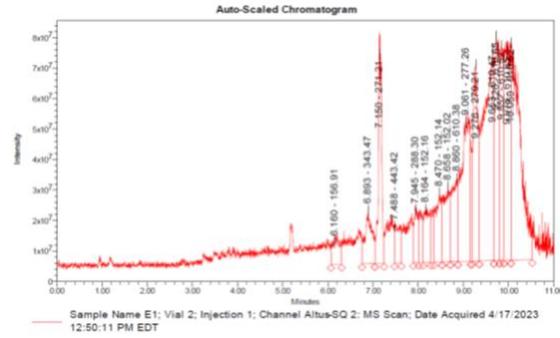
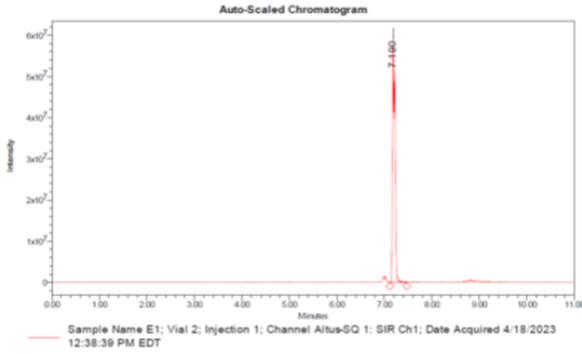
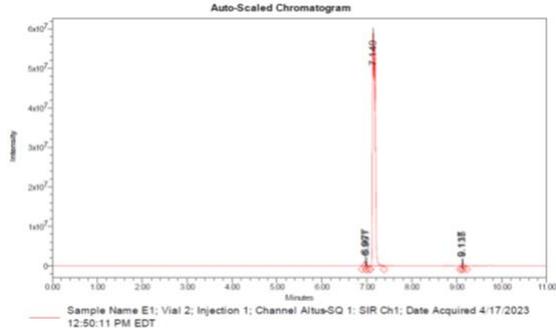
CLAE-EM (SQD) – Cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo Altus UPLC fabricante PerkinElmer. Equipamento composto dos seguintes módulos: amostrador automático (A-30 sampling module), bomba (A-30 solvent delivery module) e detector (Altus SQ detector).

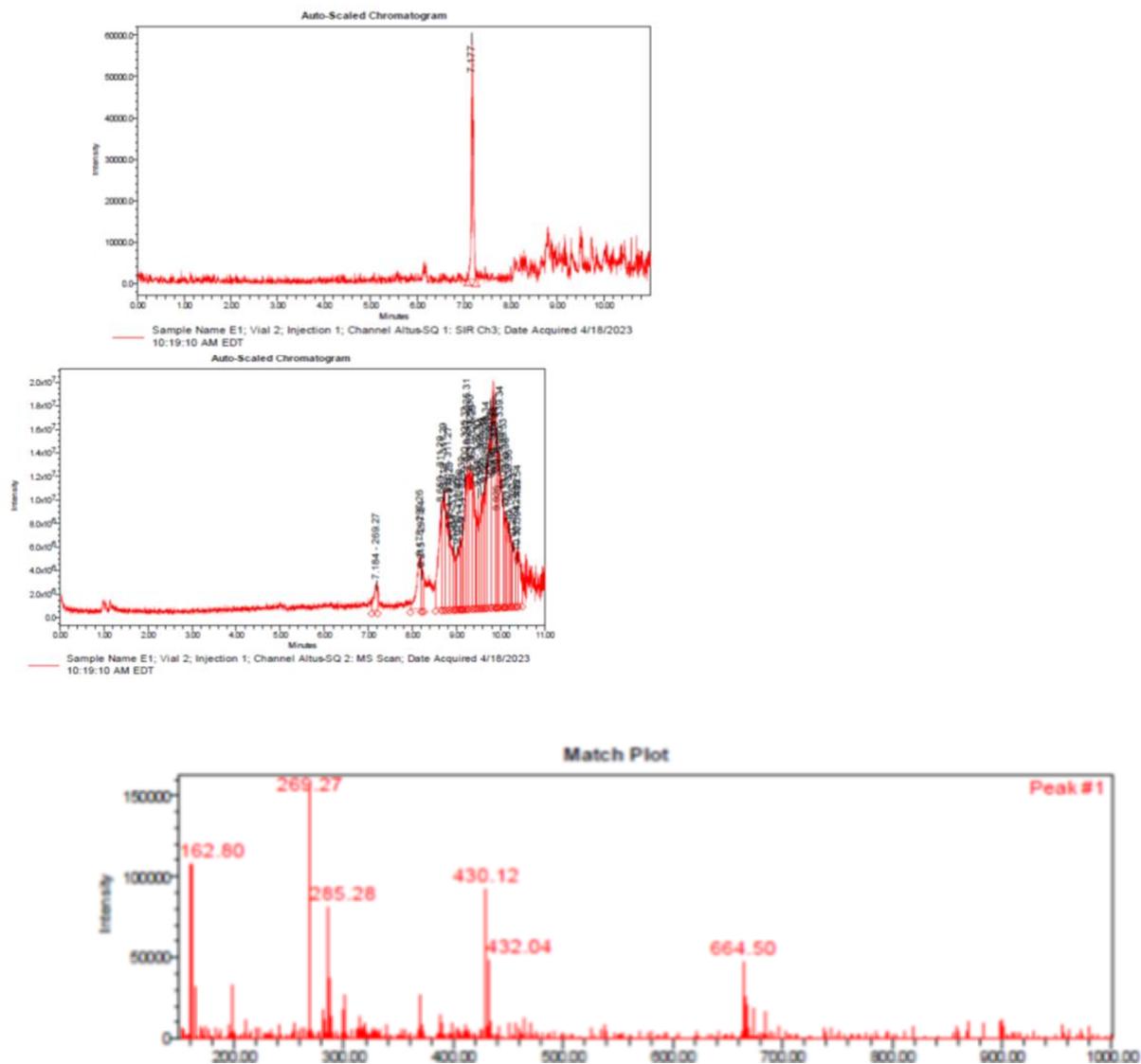
QUADRO XXXXX apresenta os resultados obtidos de área. Os resultados evidenciam que quando a voltagem aplicada no cone é fixa em 15 eV, as áreas são menores que quando aplicamos voltagem em tune, sugerindo uma possível menor formação de íons, conforme visualmente observado na Figura XXXX.

	Cromatogram	Voltagem	Volume injetado	Tempo de retenção	Área
tune	E1 m/z 271	Positiv	2 µL	7,149	246.781.
eV	E1 m/z 271 15	Positiv	2 µL	7,190	221.895.
	E1 TIC tune	Positiv	2 µL	7,150	370.217.
	E1 TIC 15 eV	Positiv	2 µL	7,192	237.706.
tune	E1 m/z 269	Negati	10 µL	7,177	161.445
	E1 TIC tune	Negati	10 µL	7,184	11.540.1
tune	E2 m/z 273	Positiv	2 µL	6,682	13.253.9
eV	E2 m/z 273 15	Positiv	2 µL	6,732	11.153.5
	E2 TIC tune	Positiv	2 µL	6,678	349.245.
	E2 TIC 15 eV	Positiv	2 µL	6,734	210.537.
tune	E2 m/z 271	Negati	10 µL	6,753	92.011

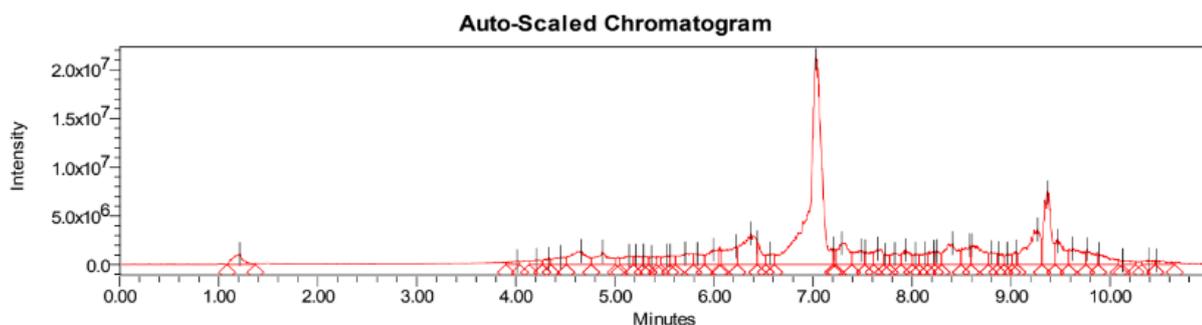
E2 TIC tune	vo	Negati	10 µL	6,749	50.929.9
E3 m/z 289	o	Positiv	2 µL	5,138	8.589.50
E3 m/z 289 15	o	Positiv	2 µL	5,170	6.463.30
E3 TIC tune	o	Positiv	2 µL	5,140	160.872.
E3 TIC 15 eV	o	Positiv	2 µL	5,164	119.692.
E3 m/z 287	vo	Negati	10 µL	5,189	22.786
E3 TIC tune	vo	Negati	10 µL	5,164	11.041.2
EE2 m/z 297	o	Positiv	2 µL	6,999	7.866.20
EE2 m/z 297	o	Positiv	2 µL	7,016	6.573.25
EE2 TIC tune	o	Positiv	2 µL	7,005	296.595.
EE2 TIC 15	o	Positiv	2 µL	7,016	151.357.
EE2 m/z 295	vo	Negati	10 µL	7,022	88.672
EE2 TIC tune	vo	Negati	10 µL	7,014	14.299.7
BPA m/z 227	vo	Negati	10 µL	6,598	6215342
BPA m/z 227	vo	Negati	10 µL	6,641	5839683
BPA TIC tune	vo	Negati	10 µL	6,501	1373063
BPA TIC tune	vo	Negati	10 µL	6,612	8019405

A partir dos dados do Quadro XX foi definido que as quantificações dos estrógenos seriam no módulo de ionização positiva, enquanto os compostos fenólicos seriam no módulo negativo.

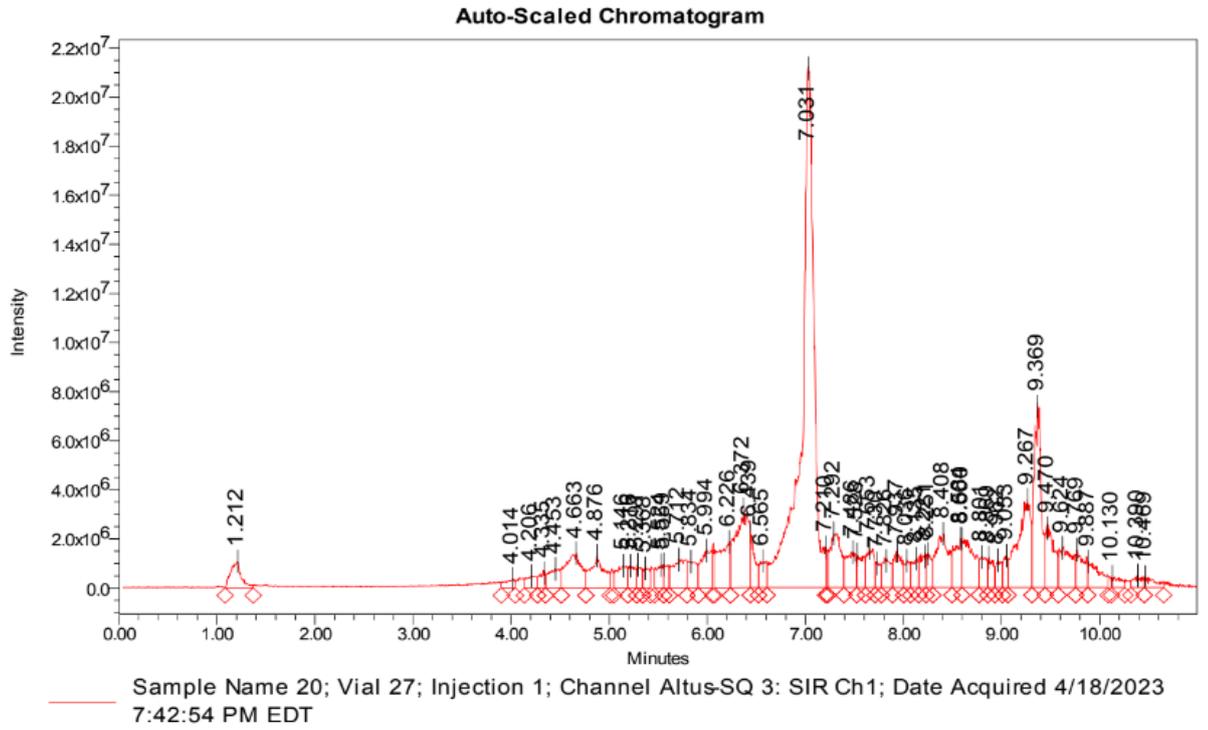




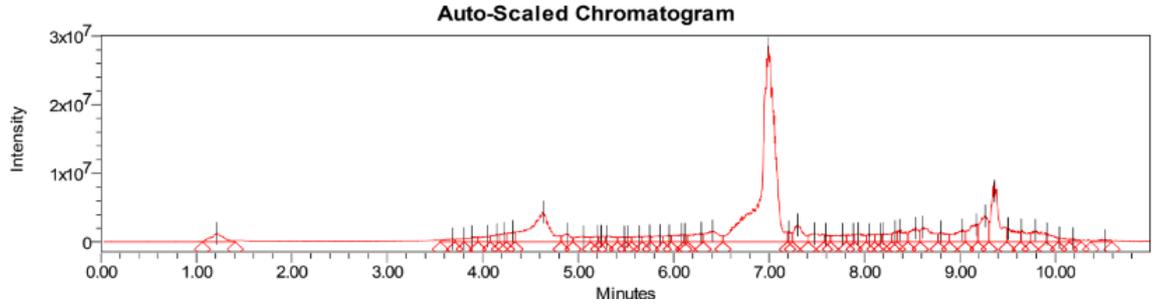
Legenda: a) Cromatograma de m/z 271 com voltagem de cone em tune, b) Cromatograma de m/z 271 com voltagem de cone fixa em 15 eV, c) Cromatograma TIC com voltagem de cone em tune, d) Cromatograma TIC com voltagem de cone fixa em 15 eV, e) espectro de massas obtido do TIC com voltagem de cone em tune, f) espectro de massas obtido do TIC com voltagem de cone fixa em 15 eV g) Cromatograma de m/z 269 com voltagem de cone em tune negativo, h) Cromatograma TIC com voltagem de cone em tune negativo e i) espectro de massas obtido do TIC com voltagem de cone em tune negativo.



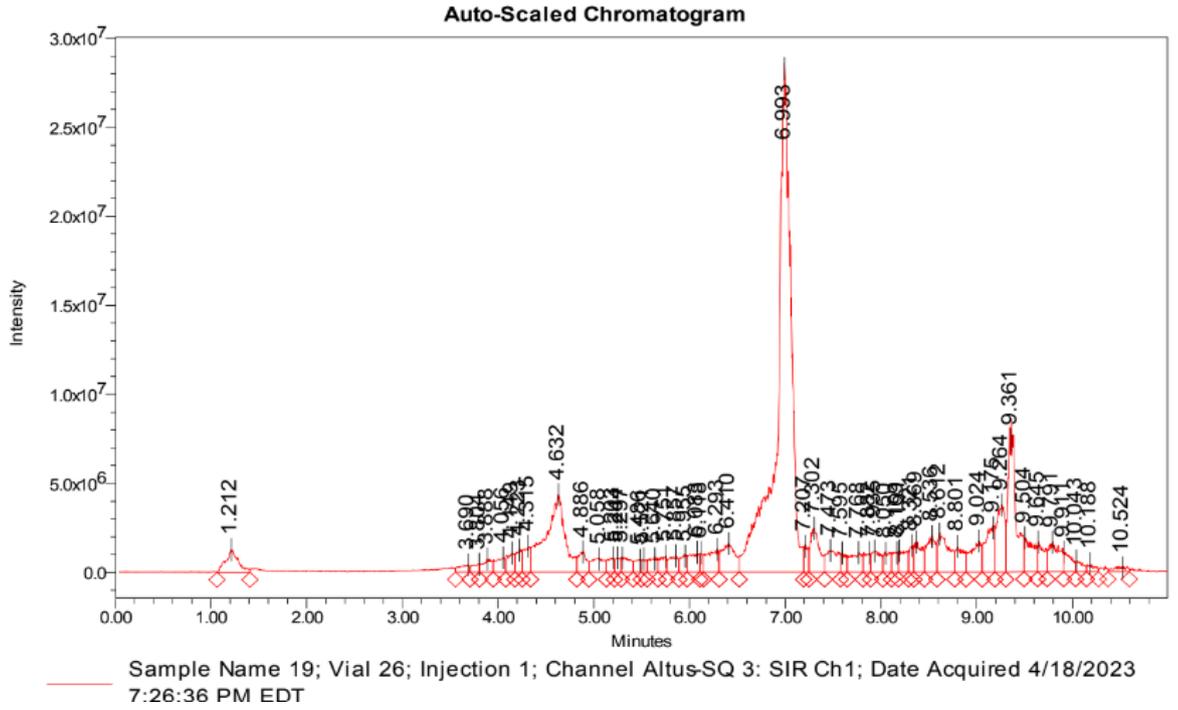
TIC amostra 20



Amostra 20 - positivo 273



TIC amostra 19



Amostra 19 - positivo 273

ANEXO 2 – Cromatogramas HPLC-DAD

Figura 5: Pico do padrão de E1 no comprimento de onda de 280 nm, indicando tempo de retenção de 17,114 minutos.

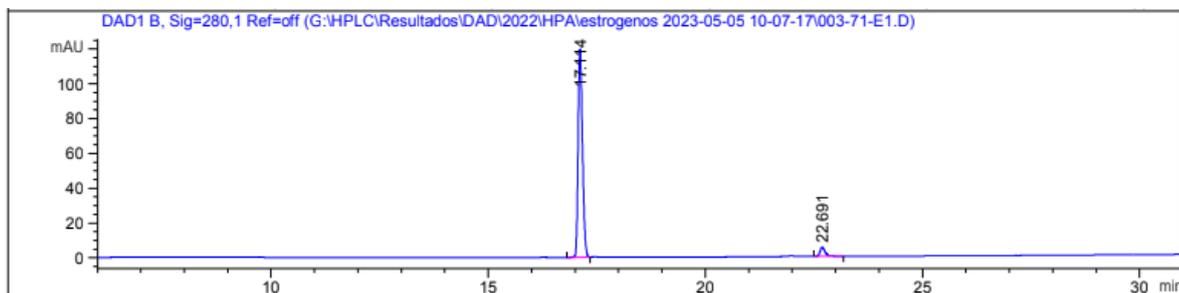


Figura 6: Pico do padrão de E2 no comprimento de onda de 280 nm, indicando tempo de retenção de 16,297 minutos.

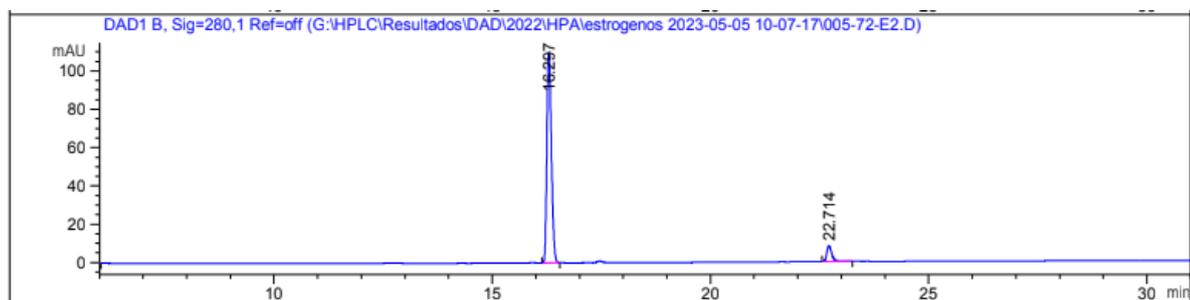


Figura 7: Pico do padrão de E3 no comprimento de onda de 280 nm, indicando tempo de retenção de 12,349 minutos.

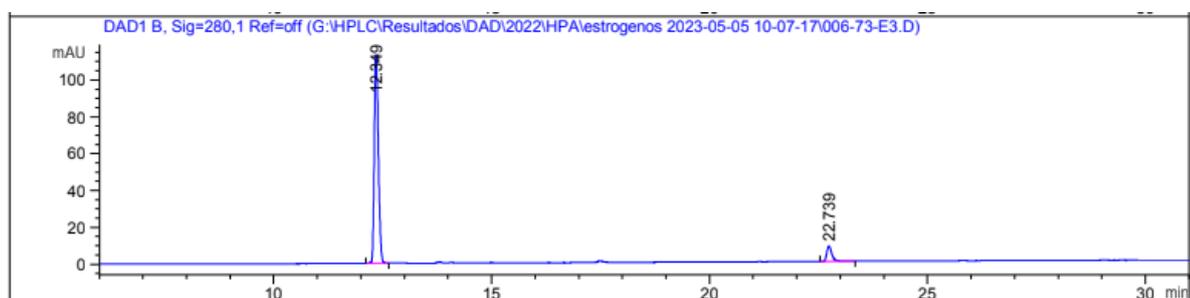


Figura 8: Pico do padrão de EE2 no comprimento de onda de 280 nm, indicando tempo de retenção de 16,921 minutos.

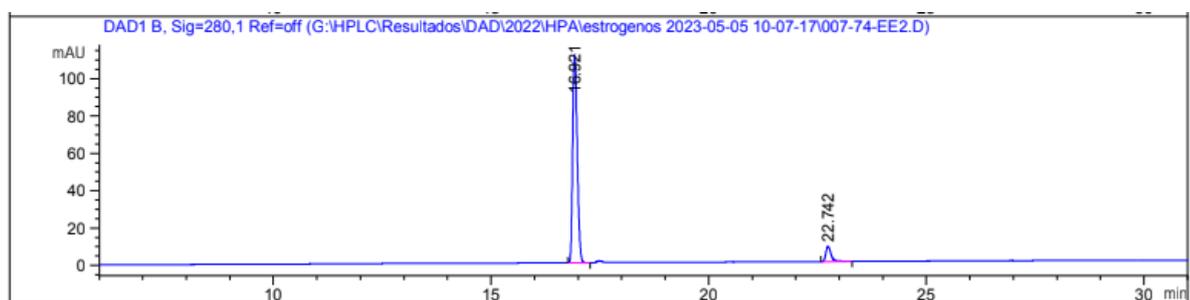


Figura 9: Pico do padrão de 4NP no comprimento de onda de 280 nm, indicando tempo de retenção de 25,059 minutos.

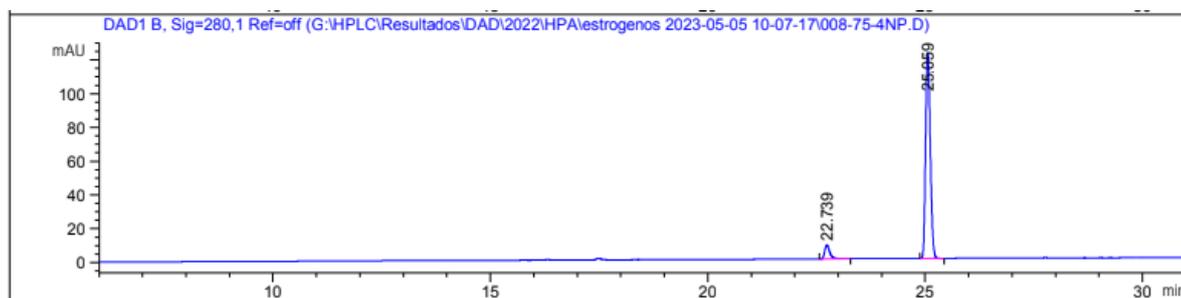


Figura 10: Pico do padrão de BPA no comprimento de onda de 235 nm, indicando tempo de retenção de 15,752 minutos.

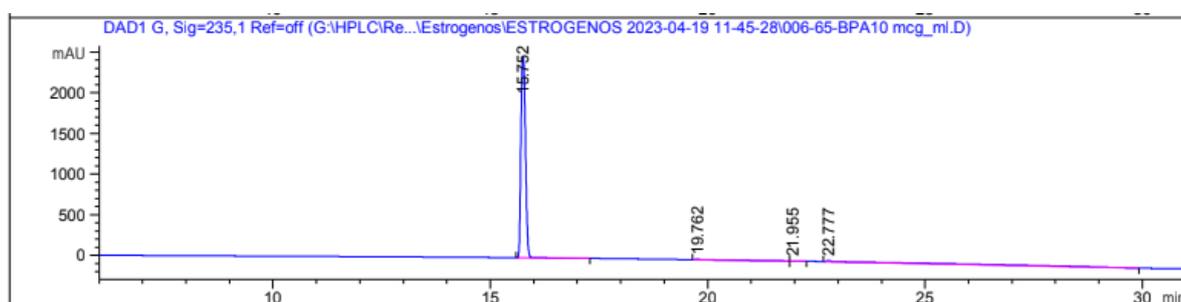
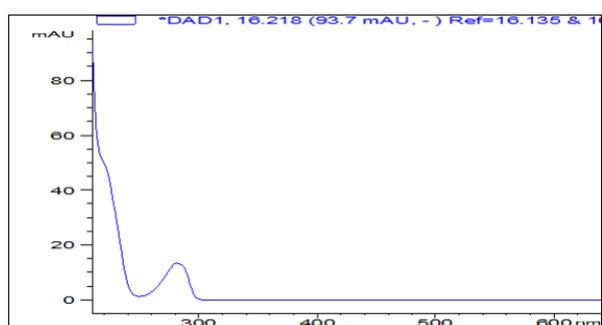
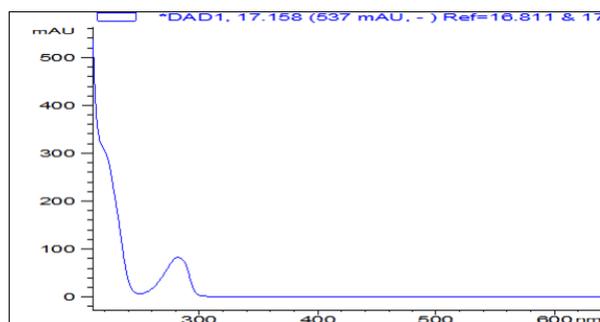
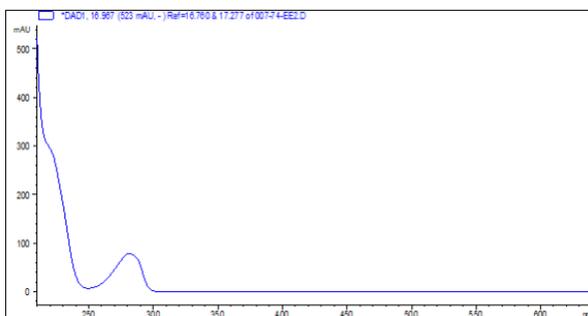
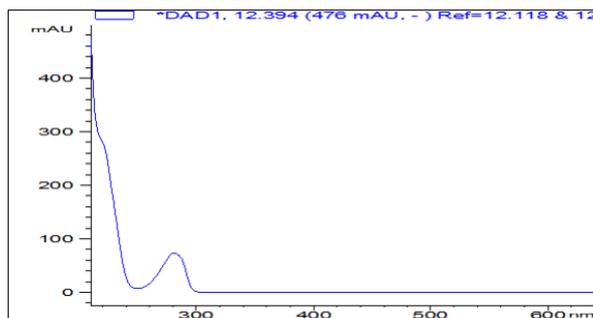


Figura 11: Espectros de cada um dos compostos de interesse nos respectivos comprimentos de onda.



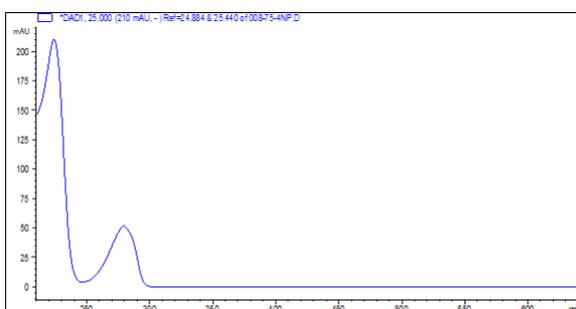
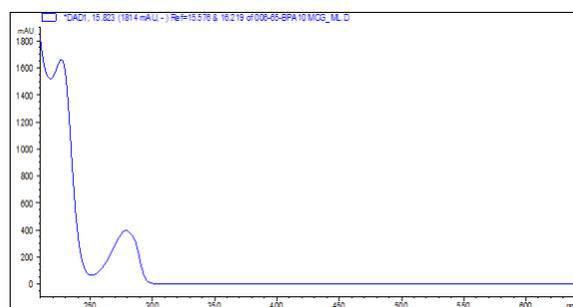
(a) E1

(b) E2



(c) E3

(d) EE2



(e) 4NP

(f) BPA

Legenda: (a) E1 (b) E2

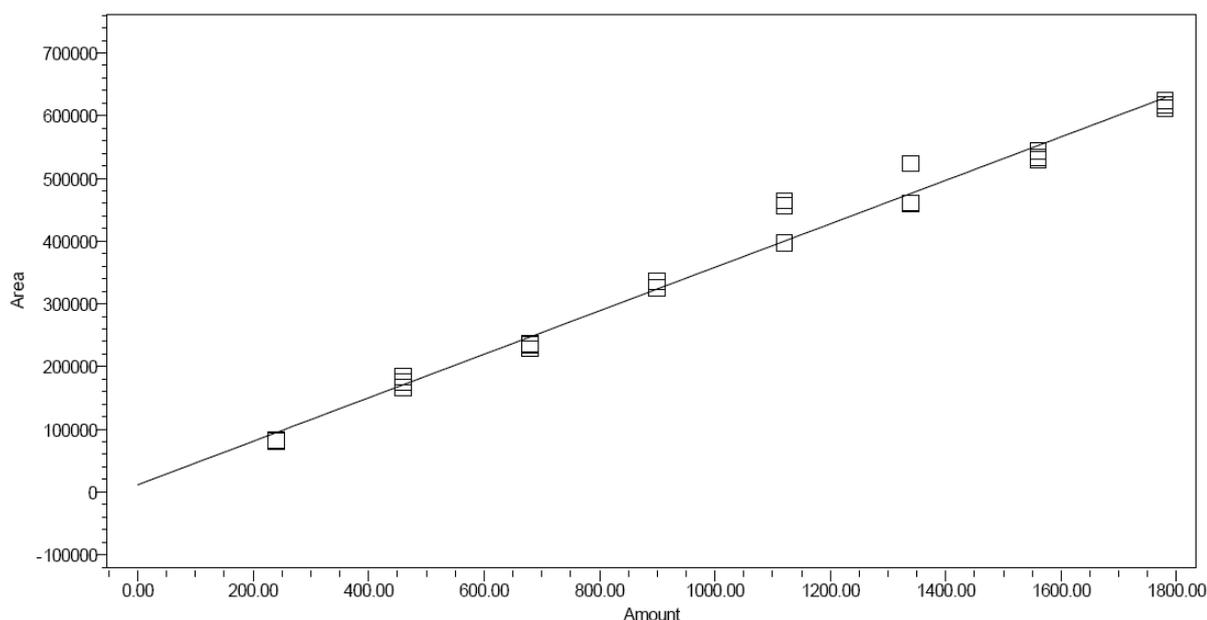
ANEXO 3 – Cromatogramas HPLC-FLU/DAD

A seguir estão apresentados os cromatogramas das amostras de Rio das Ostras realizadas no HPLC-FLU/DAD do laboratório de Engenharia Sanitária da UERJ. As amostras analisadas por este método foram extratos de sedimento *in natura* intencionalmente dopados com DE (mix de compostos, BPA e E2) e sem dopagem prévia. Ainda foram avaliados por esta metodologia os sedimentos liofilizados e não.

UERJ Eng Sanitaria

Project Name Desreguladores Endocrinos

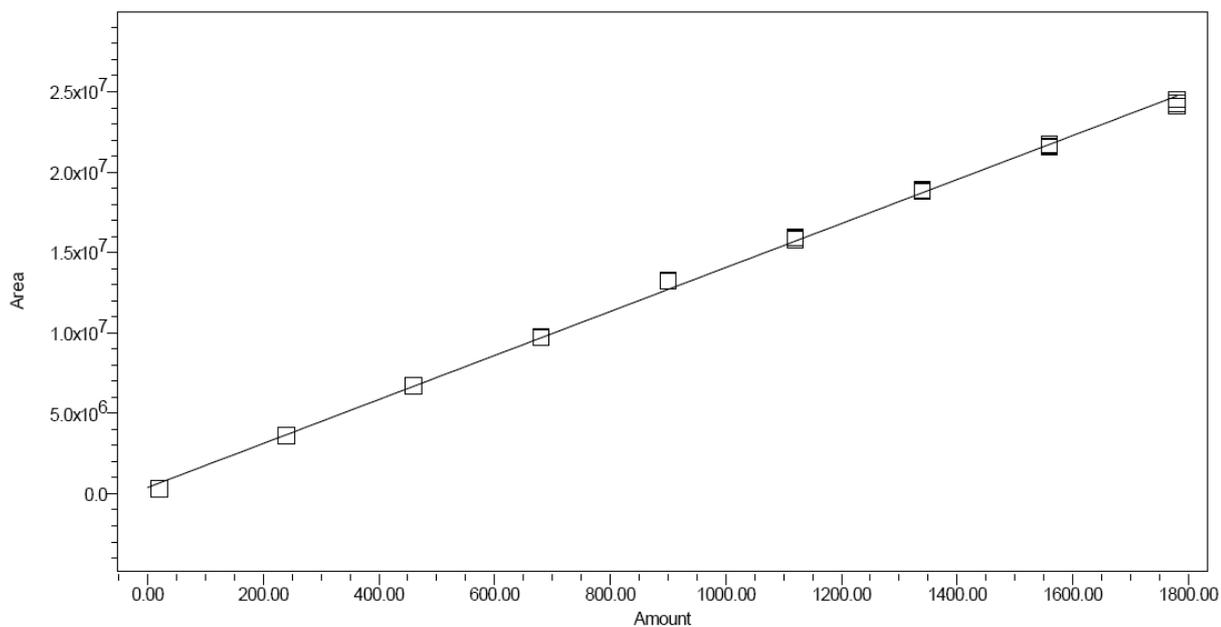
Reported by User: UERJ



Name: E1; Time: 9.468; Fit Type: Linear (1st Order); R: 0.991264; R²: 0.982605; Equation: Y = 3.47e+002 X + 1.14e+004; Date Calibrated: 2/10/2023 12:32:57 PM BRST

UERJ Eng Sanitaria

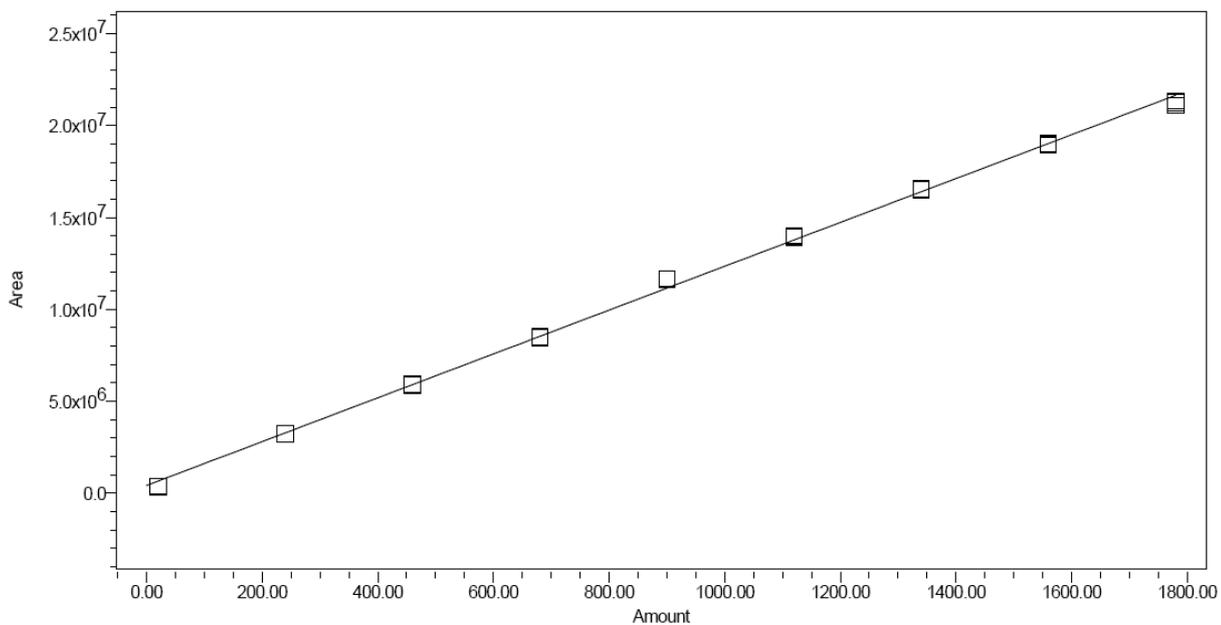
Project Name Desreguladores Endocritos
Reported by User: UERJ



Name: E2; Time: 8.183; Fit Type: Linear (1st Order); R: 0.999337; R²: 0.998675; Equation: $Y = 1.37e+004 X + 3.96e+005$; Date Calibrated: 2/10/2023 12:32:57 PM BRST

UERJ Eng Sanitaria

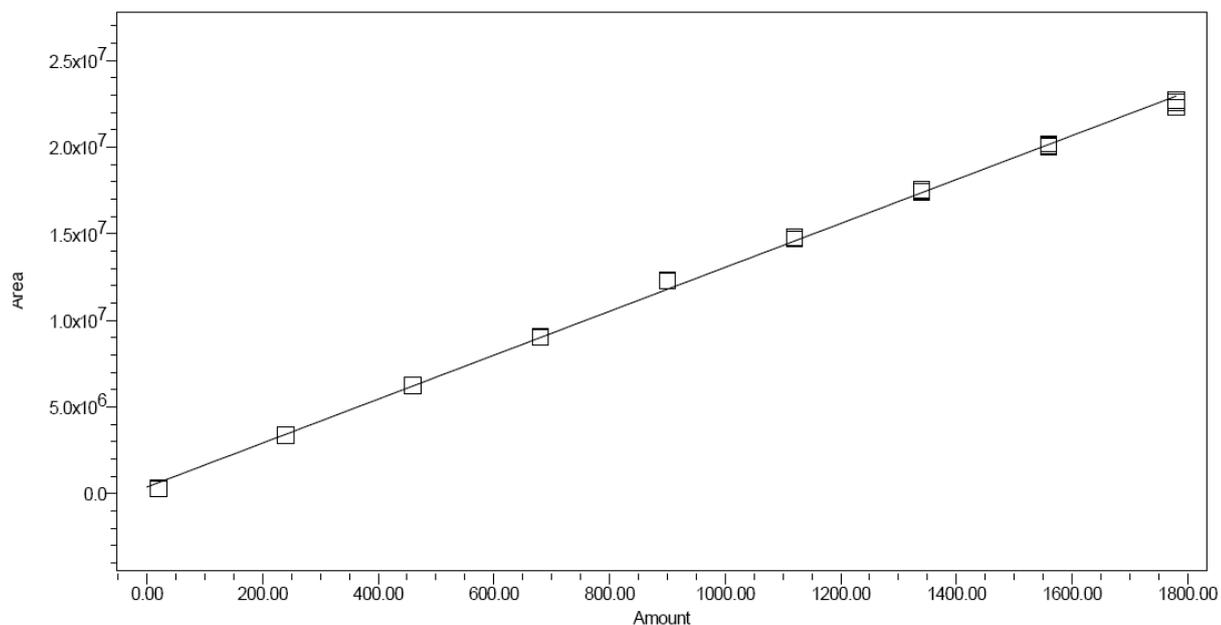
Project Name Desreguladores Endocritos
Reported by User: UERJ



Name: E3; Time: 3.932; Fit Type: Linear (1st Order); R: 0.999287; R²: 0.998574; Equation: $Y = 1.19e+004 X + 4.20e+005$; Date Calibrated: 2/10/2023 12:32:57 PM BRST

UERJ Eng Sanitaria

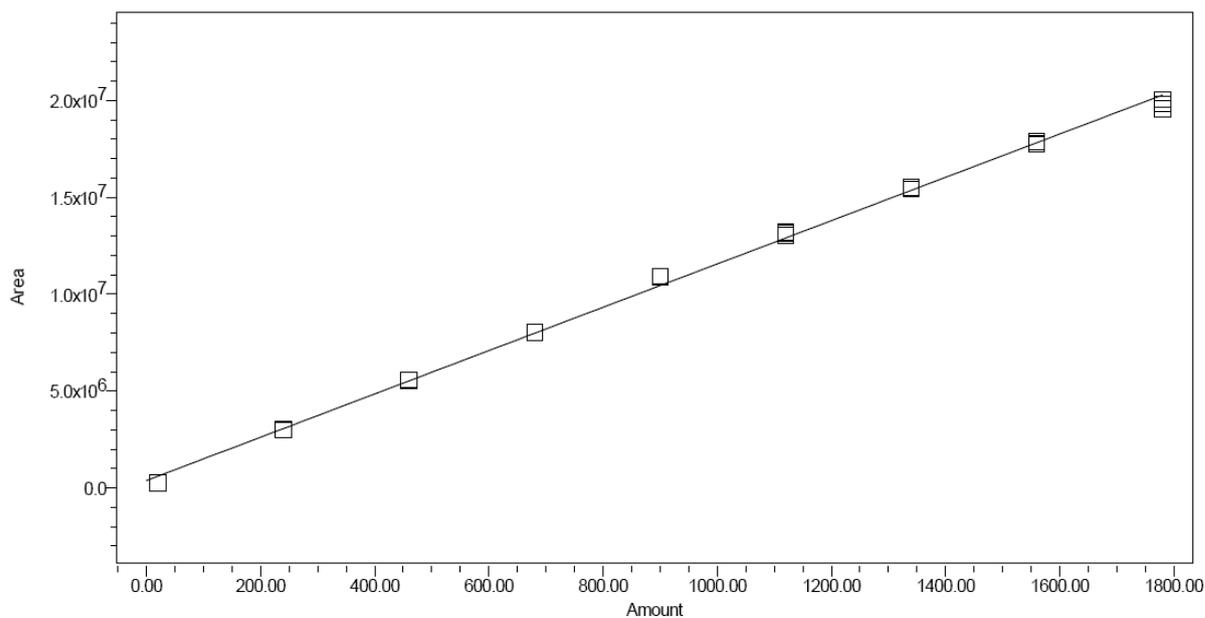
Project Name Desreguladores Endocrinos
Reported by User: UERJ



Name: EE2; Time: 8.688; Fit Type: Linear (1st Order); R: 0.999314; R²: 0.998628; Equation: $Y = 1.27e+004 X + 3.81e+005$; Date Calibrated: 2/10/2023 12:32:57 PM BRST

UERJ Eng Sanitaria

Project Name Desreguladores Endocrinos
Reported by User: UERJ



Name: BPA; Time: 6.797; Fit Type: Linear (1st Order); R: 0.999090; R²: 0.998181; Equation: $Y = 1.12e+004 X + 3.82e+005$; Date Calibrated: 2/10/2023 12:32:57 PM BRST

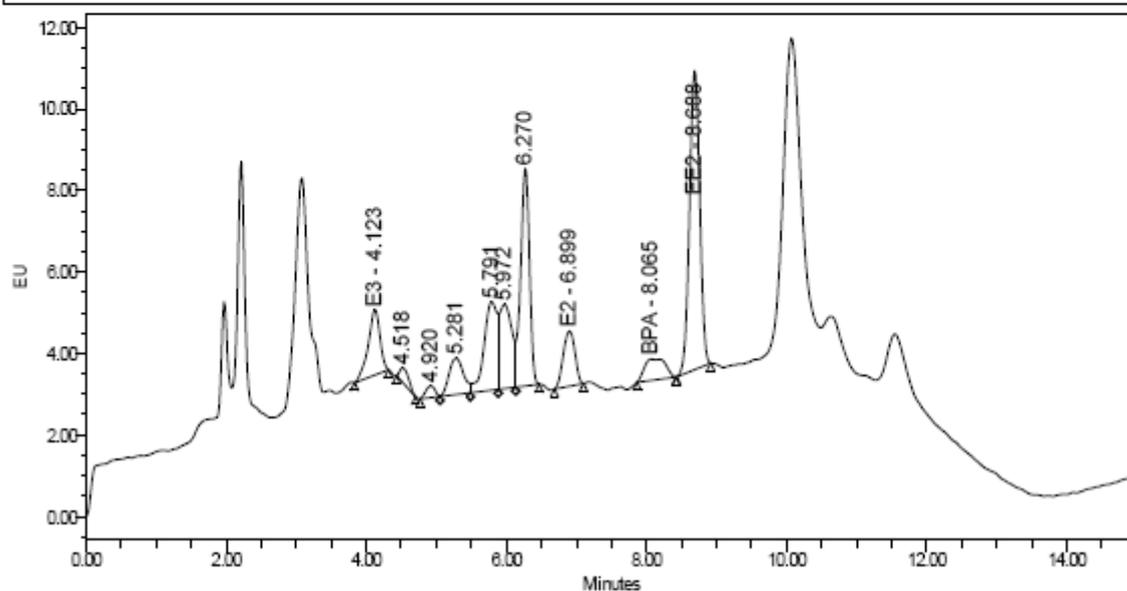
UERJ Eng Sanitaria

Project Name Desreguladores Endocinos
Reported by User: UERJ



SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Ponto1_RDO_1campo	Acquired By:	UERJ
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	5/13/2022 9:16:21 PM BRST
Vial:	1:A,2	Acq. Method:	Gradiente 2
Injection #:	2	Date Processed:	5/19/2022 6:59:17 PM BRST
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2475ChA ex280/em306
Run Time:	15.00 Minutes	Sample Set Name:	Louise 130522



UERJ Eng Sanitaria

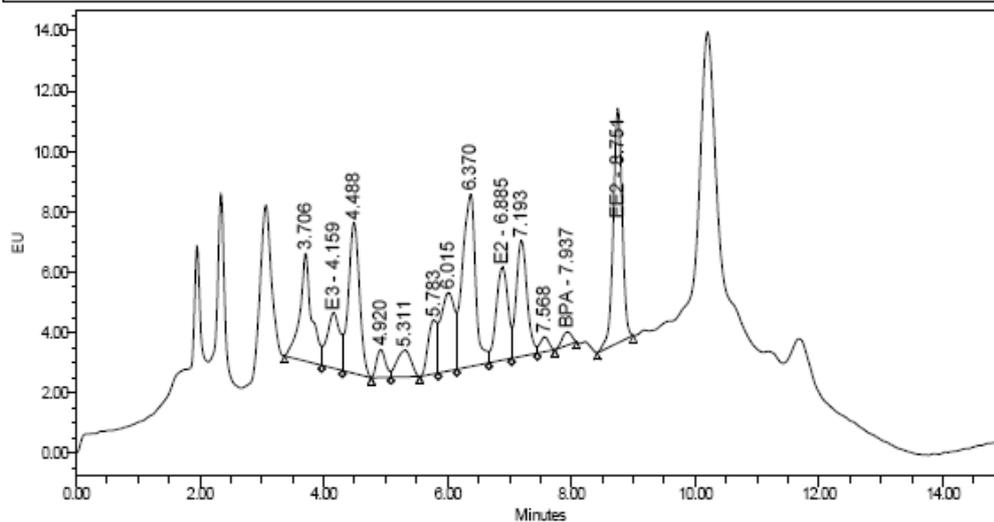
Project Name Desreguladores Endocinos

Reported by User: UERJ



SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Ponto2_RDO_1campo	Acquired By:	UERJ
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	5/13/2022 10:02:21 PM BRST
Vial:	1:A,3	Acq. Method:	Gradiente 2
Injection #:	2	Date Processed:	5/19/2022 6:59:16 PM BRST
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2475ChA ex280/em306
Run Time:	15.00 Minutes	Sample Set Name:	Louise 130522



UERJ Eng Sanitaria

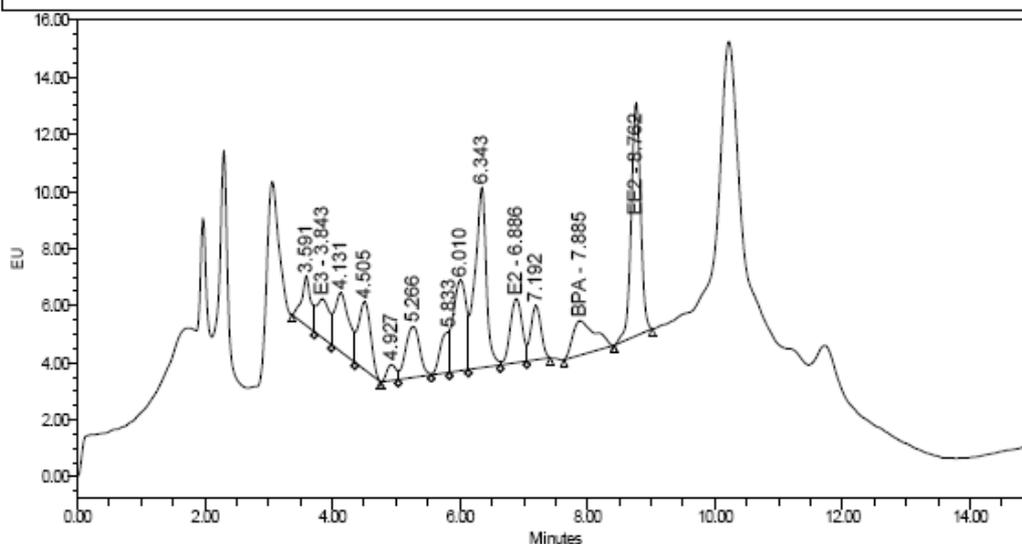
Project Name Desreguladores Endocinos

Reported by User: UERJ



SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Ponto3_RDO_1campo	Acquired By:	UERJ
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	5/13/2022 10:33:02 PM BRST
Vial:	1:A,4	Acq. Method:	Gradiente 2
Injection #:	1	Date Processed:	5/19/2022 6:59:16 PM BRST
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2475ChA ex280/em306
Run Time:	15.00 Minutes	Sample Set Name:	Louise 130522



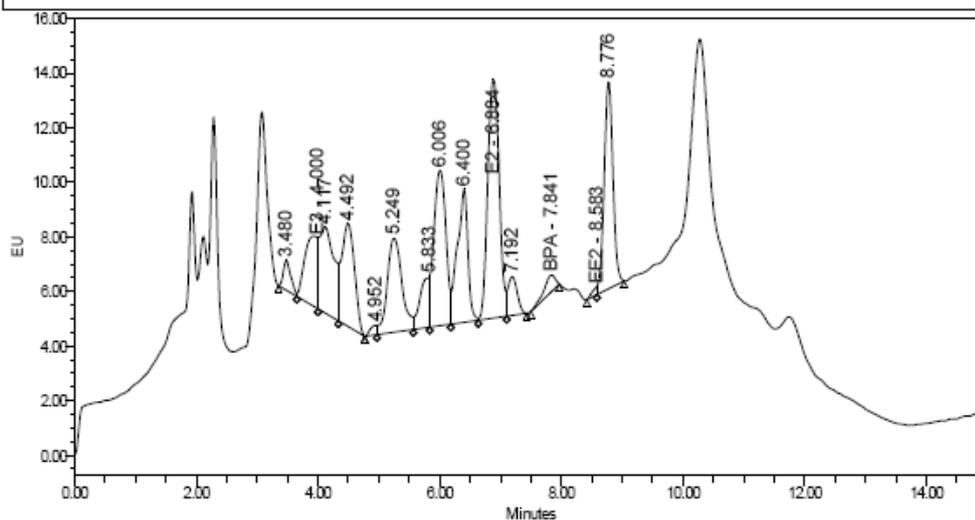
UERJ Eng Sanitaria

Project Name Desreguladores Endocinos
Reported by User: UERJ



SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Ponto4_RDO_1campo	Acquired By:	UERJ
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	5/13/2022 11:49:41 PM BRST
Vial:	1:A,5	Acq. Method:	Gradiente 2
Injection #:	3	Date Processed:	5/19/2022 6:59:16 PM BRST
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2475ChA ex280/em306
Run Time:	15.00 Minutes	Sample Set Name:	Louise 130522



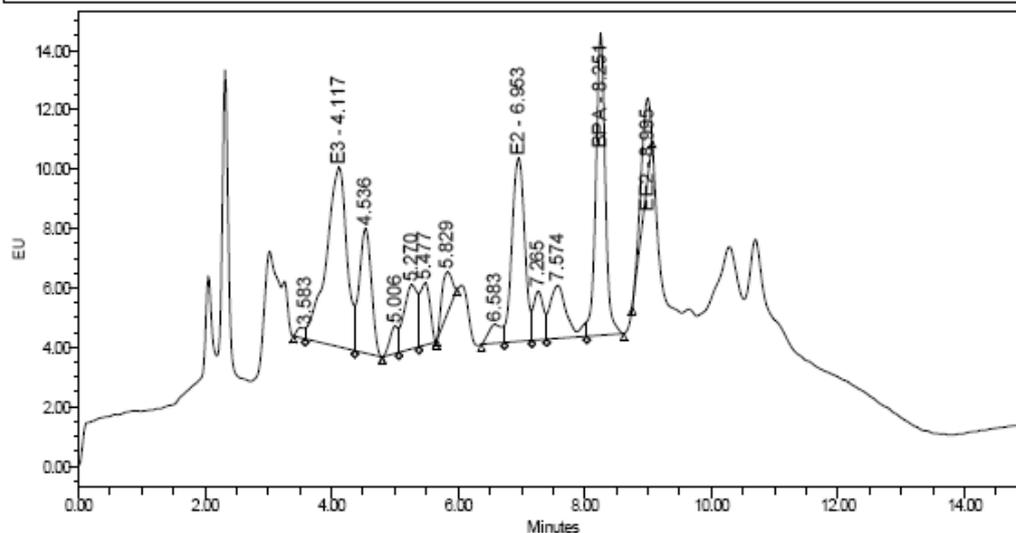
UERJ Eng Sanitaria

Project Name Desreguladores Endocinos
Reported by User: UERJ



SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	ponto 5 louise	Acquired By:	UERJ
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	3/28/2022 10:16:37 PM BRST
Vial:	1:A,2	Acq. Method:	Gradiente 2
Injection #:	2	Date Processed:	3/29/2022 6:36:55 PM BRST
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2475ChA ex280/em306
Run Time:	15.00 Minutes	Sample Set Name:	28032022 louise



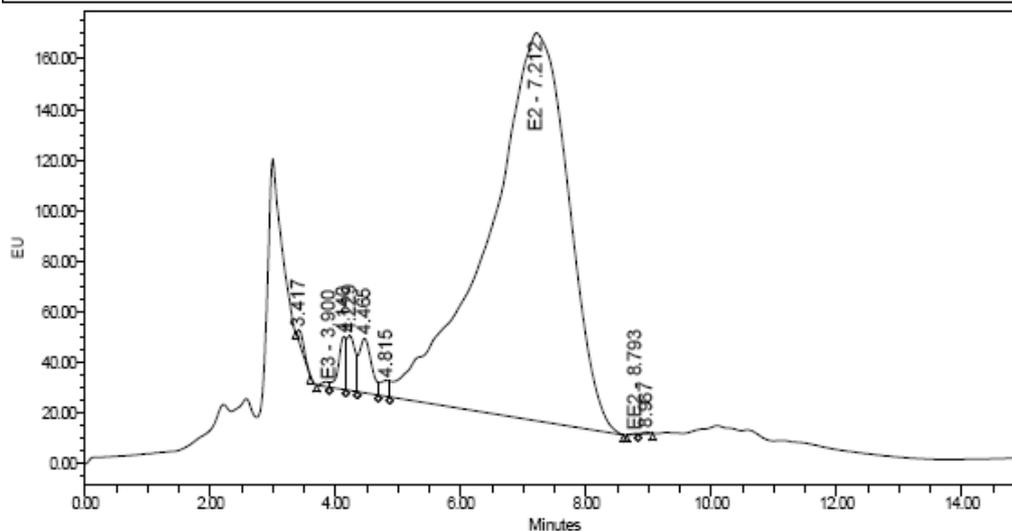
UERJ Eng Sanitaria

Project Name Desreguladores Endocinos
Reported by User: UERJ



SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	EstSeco_RDO_1campo	Acquired By:	UERJ
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	5/14/2022 1:21:43 AM BRST
Vial:	1:A,7	Acq. Method:	Gradiente 2
Injection #:	3	Date Processed:	5/19/2022 6:59:15 PM BRST
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2475ChA ex280/em306
Run Time:	15.00 Minutes	Sample Set Name:	Louise 130522



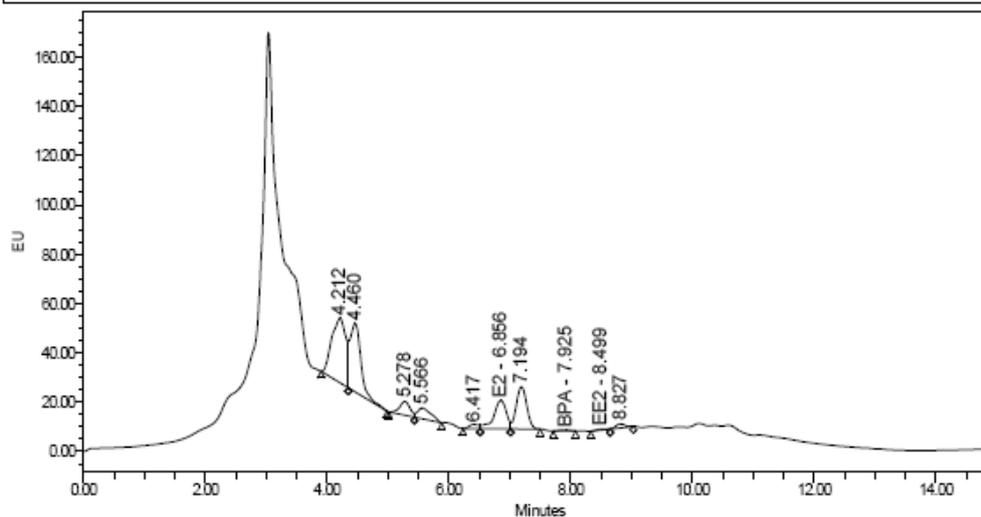
UERJ Eng Sanitaria

Project Name Desreguladores Endocinos
Reported by User: UERJ



SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	EstUmido_RDO_1campo	Acquired By:	UERJ
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	5/14/2022 12:20:22 AM BRST
Vial:	1:A,6	Acq. Method:	Gradiente 2
Injection #:	2	Date Processed:	5/19/2022 6:59:16 PM BRST
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2475ChA ex280/em306
Run Time:	15.00 Minutes	Sample Set Name:	Louise 130522



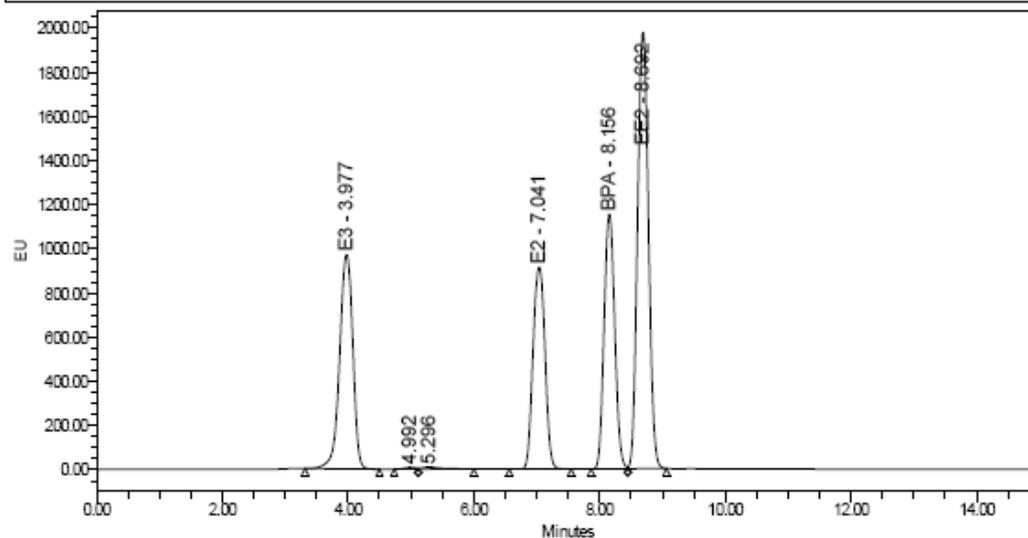
UERJ Eng Sanitaria

Project Name Desreguladores Endocinos
Reported by User: UERJ



SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	padrao mix	Acquired By:	UERJ
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	3/28/2022 9:45:56 PM BRST
Vial:	1:A,1	Acq. Method:	Gradiente 2
Injection #:	4	Date Processed:	3/29/2022 6:36:55 PM BRST
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2475ChA ex280/em306
Run Time:	15.00 Minutes	Sample Set Name:	28032022 louise



ANEXO 4 - DADOS COMPLETOS DO YES

Tabela X: Resultados de atividade estrogênica, antiestrogênica e citotoxicidade medidos a partir do ensaio YES para todos os pontos de coleta do estudo.

PT	Matriz	EQ-E2 (ng L ⁻¹ ou ng g ⁻¹)		Citotoxicidade e na diluição (%)	Limite de Detecção – LD (ng L ⁻¹ ou ng g ⁻¹)	Efeito Observado
		Média	Desvio			
1	água	40,3	0,5	0	0,047	-
	MP	1,3	0,0	0	0,047	-
	sedimento (1)	1,5	0,1	0	0,005	-
	sedimento (2)	1,5	0,1	0	0,005	-
2	água	0,5	0,0	0	0,005	-
	MP	<LD	-	0	0,047	N
	sedimento (1)	<LD	-	0	0,005	E
	sedimento (2)	<LD	-	0	0,005	E
3	água	<LD	-	0	0,047	E
	MP	<LD	-	0	0,047	E
	sedimento (1)	<LD	-	0	0,005	E
	sedimento (2)	0,13	0,01	0	0,005	-
4	água	5,84	0,00	0	0,023	-
	MP	1,00	0,94	0	0,023	-
	sedimento (1)	0,05	0,00	0	0,001	-
	sedimento (2)	<LD	-	0	0,005	E
5	água	0,43	0,00	0	0,012	-
	MP	0,86	0,18	0	0,012	-
	sedimento (1)	0,17	0,01	0	0,001	-
	sedimento (2)	<LD	-	0	0,005	E
6	sedimento	<LD	-	0	0,001	NR
	sedimento (liof.)	<LD	-	0	0,001	NR
7	sedimento	<LD	-	0	0,001	NR
	sedimento (liof.)	<LD	-	0	0,001	NR
8	água	<LD	-	0	0,012	NR
	sedimento	<LD	-	0	0,001	NR
	sedimento (liof.)	<LD	-	0	0,001	NR
9	água	0,34	-	0	0,012	NR
	sedimento	<LD	-	0	0,001	NR
	sedimento (liof.)	<LD	-	0	0,001	NR
10	sedimento	0,04	8,3E-05	0	0,001	NR
	sedimento (liof.)	<LD	-	0	0,001	NR

Legenda: (-) atividade estrogênica quantificada; (N) nenhum efeito observado; (E) atividade estrogênica observada (potencialização do efeito do 17β-estradiol adicionado); (NR) avaliação de atividade antiestrogênica não realizada.