

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA ENGENHARIA AMBIENTAL**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DO
HORMÔNIO 17 α -METILTESTOSTERONA EM AMOSTRAS DE ÁGUA E DE
SEDIMENTOS DE PISCICULTURA : ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS COM
CLADÓCEROS**

Sandra Zago Falone

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos quesitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Engenharia Ambiental.

Orientadora: Profa Dr Eny Maria Vieira

**São Carlos
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

F196d Falone, Sandra Zago
Desenvolvimento de métodos para a determinação do hormônio 17 α -Metiltestosterona em amostras de água e de sedimentos de piscicultura : ensaios ecotoxicológicos com cladóceros / Sandra Zago Falone; orientador Eny Maria Vieira. -- São Carlos, 2007.

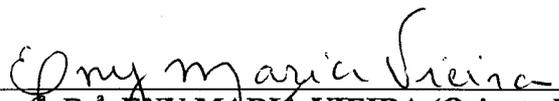
Tese (Doutorado-Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração : Ciências da Engenharia Ambiental) -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2007.

1. Hormônio. 2. Água. 3. Sedimentos. 4. Ecotoxicidade.
I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Licenciada **SANDRA ZAGO FALONE**

Tese defendida e julgada em 09/05/2007 perante a Comissão Julgadora:



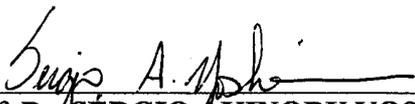
Prof. Dr.^a **ENY MARIA VIEIRA (Orientadora)**
(Instituto de Química de São Carlos/USP)

APROVADA



Prof. Associado **VALDIR SCHALCH**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

APROVADO



Prof. Dr. **SERGIO AKINOBU YOSHIOKA**
(Instituto de Química de São Carlos/USP)

Aprovada



Prof. Dr. **SANDRO XAVIER DE CAMPOS**
(Universidade Estadual de Ponta Grossa/UEPG)

APROVADA

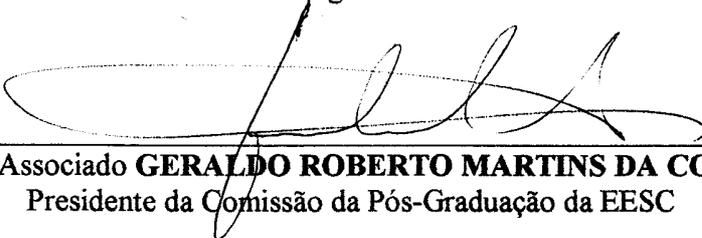


Dr. **PAULO JORGE MARQUES CORDEIRO**
(Instituto de Química de São Carlos/USP)

APROVADA



Prof. Associado **IVALDO LUIZ GAETA ESPINDOLA**
Decano
Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Engenharia Ambiental



Prof. Associado **GERALDO ROBERTO MARTINS DA COSTA**
Presidente da Comissão da Pós-Graduação da EESC

**Aos meus amados pais JOSIAS e OZANA...
Por tudo que fizeram e fazem por mim.
Por me incentivar a seguir enfrente em busca
de meus ideais...
Pois sem a preciosa ajuda de vocês eu jamais
conseguiria chegar onde cheguei.
"Dedico-lhes esta conquista com a minha
mais profunda admiração e respeito."**

AGRADECIMENTOS

- A *Deus* pela vida e por ter iluminado o meu caminho com sua luz.
- À minha orientadora *Profa. Dr Eny Maria Vieira*, que foi muito mais que uma "parceria de trabalho", foi uma "pequena" grande amiga, que fez com que eu crescesse profissionalmente e pessoalmente. Pela orientação, pela amizade, pelos conselhos e pela confiança depositada em meu trabalho...
...Obrigada por me apoiar e incentivar... Serei sempre grata...
- Aos meus pais *Josias e Ozana*, pelo exemplo que são e por me ensinarem o que há de mais precioso nesta vida, a integridade.
- Aos meus "tios-pais" *Elvírio e Guinera*, pelo carinho, incentivo e confiança.
- À minha irmã *Adriana* pela compreensão e carinho de sempre.
- Aos meus avós: *Olímpio e Vergínia, Durvalina e Sebastião "in memorian"*, por me ensinarem verdadeiros valores para a vida, através do jeito simples de viver; além dos sábios conselhos.
- Aos meus afilhados, amores da minha vida: *Gabriel, Laura e Leonardo*.
- Às amigas *Ana Lígia, Andréa, Célia, Elina, Flaviana, Regina, Susete e Tânia* pelo companheirismo e também pela cumplicidade de sempre.
- Às vizinhas *Manu, Paula, Renata e Tuca* pela amizade e pelas "infindáveis" conversas.
- À secretária do CRHEA *Claudete*, pela atenção e carinho.
- À secretária *Vanessa Adriana Jarina Hyppolito*, pela eficiência e atenção de sempre.
- À *Dr Liane Printes* e à *Paula Bianchini* pela amizade e pela imensa ajuda.
- Ao *Dr Paulo Cordeiro* da Central de Análises Químicas e Instrumentais (CAQI) pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

- Ao *Prof. Dr Luiz Carlos Gomide* pela amizade e pela ajuda no abstract deste trabalho.
- Ao *Prof. Dr Antonio Eduardo da Hora Machado* pelo incentivo na carreira científica e pela amizade.
- Aos colegas integrantes e ex-integrantes do laboratório de Química Analítica Aplicada a Medicamentos e Ecossistemas Aquáticos e Terrestres, pela agradável convivência nestes anos de estudo e, por todas as oportunidades de trabalho em grupo: *Ademir, Cleide, Daniel, Edson Copi "in memorian", Eleisy, Eliane, Fabiana, Fernanda, Flávio, Janete, Juliana, Keila, Luigi, Luís Gustavo, Marcos, Mateus, Melisa, Ozelito, Paulino, Renata, Ricardo Coelho, Ricardo Luvizotto, Ricardo Reis, Sandro, Sérgio e Wilma*, também pelas risadas inesquecíveis e insubstituíveis.
- Ao *Amândio* e à *Dr Clarice Botta* do Núcleo de Estudos de Ecossistemas Aquáticos do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CRHEA), pela ajuda no desenvolvimento dos experimentos de ecotoxicidade.
- Ao técnico do CRHEA *Marcelo* pela ajuda nos testes de granulometria.
- À funcionária *Mara* da biblioteca do CRHEA, às funcionárias da biblioteca do IQSC, principalmente: *Eliane, Regina, Sônia e Wilneide* e também à *Eleninha* da biblioteca central.
- Aos funcionários do IQSC: *Cidinha e Renata Meire* (laboratório de ensino), *Fátima, Lourdes, Marinalva e Roseli* (serviços gerais), *Moisés* (portaria), *Élvio* (oficina eletrônica), *Edinho* (oficina de vidros), *Alex, Ednelson, Milton e Toninho* (oficina mecânica) e *Ângelo, Flávio, Irineu e Talhati* (informática), pela alegria de tê-los como companheiros diariamente.
- Ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC), por ceder o espaço físico para o desenvolvimento deste trabalho.
- À Universidade de São Paulo pela oportunidade oferecida.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.
- A todas as pessoas que de maneira indireta contribuíram para este passo decisivo em minha vida, agradeço e peço a Deus que os recompensem sempre.

MUITO OBRIGADA!

Não sei... se a vida é curta ou longa demais para nós.
Mas sei que nada do que vivemos tem sentido,
se não tocarmos o coração das pessoas.

Muitas vezes basta ser:
colo que acolhe,
braço que envolve,
palavra que conforta,
silêncio que respeita,
alegria que contagia,
lágrima que corre,
olhar que sacia, amor que promove.

E isso não é coisa de outro mundo:
é o que dá sentido à vida.
É o que faz com que ela
não seja nem curta, nem longa demais,
mas que seja intensa, verdadeira e pura...
enquanto durar.

(Cora Coralina)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. JUSTIFICATIVA.....	04
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	07
3.1. Água como bem comum.....	07
3.2. Aqüicultura.....	09
3.3. Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	15
3.4. Hormônios.....	17
3.4.1. 17 α -metiltestosterona.....	20
3.5. Hormônios e legislação.....	23
3.6. Métodos de extração e técnica analítica empregada na determinação de resíduos de hormônio em amostras de água e de sedimentos.....	25
3.6.1. Extração em fase sólida (EFS).....	25
3.6.2. Ultra-som.....	27
3.6.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	27
3.7. Validação da metodologia para determinação do hormônio 17 α -metiltestosterona em amostras de água e de sedimentos.....	29
3.7.1. Linearidade e faixa de aplicação.....	31
3.7.2. Sensibilidade.....	34
3.7.3. Seletividade.....	35
3.7.4. Precisão.....	36

3.7.5. Exatidão.....	38
3.7.6. Limite de detecção (LD).....	40
3.7.7. Limite de quantificação (LQ).....	41
3.7.8. Adição de padrão.....	42
3.8. Ecotoxicologia.....	44
3.8.1. Testes de ecotoxicidade.....	45
3.8.2. Organismos teste: Cladóceros (<i>Daphnia similis</i> e <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>).....	46
4. OBJETIVOS.....	51
4.1. Objetivo geral.....	51
4.2. Obejtivos específicos.....	51
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	53
5.1. Seleção do hormônio para estudo.....	53
5.2. Local de estudo.....	53
5.3. Amostragem.....	56
5.3.1. Coleta das amostras de água.....	56
5.3.2. Coleta das amostras dos sedimentos.....	57
5.4. Reagentes e solventes utilizados.....	58
5.5. Determinação da porcentagem de matéria orgânica dos sedimentos via calcinação (pesagem).....	59
5.6. Granulometria.....	59
5.7. Solução padrão de 17 α -metiltestosterona e curva analítica.....	59
5.8. Condições cromatográficas para determinação do hormônio nas amostras de água e de sedimentos de piscicultura.....	60
5.9. Limpeza da vidraria.....	60
5.10. Procedimento para a extração do hormônio das amostras de água e de sedimentos.....	61
5.10.1. Amostras de água.....	61
5.10.1.1. Determinação do nitrogênio amoniacal (amônia) nas amostras de água da piscicultura.....	61
5.10.1.2. Determinação de coliformes fecais nas amostras de água da piscicultura.....	62
5.10.1.3. Extração das amostras de água sem o hormônio (branco).....	63
5.10.1.4. Extração das amostras fortificadas para estudo do melhor	

solvente para eluição do analito de interesse.....	63
5.10.1.5. Extração do hormônio das amostras de água coletadas na piscicultura de Socorro.....	64
5.10.2. Amostras de sedimentos.....	65
5.10.2.1. Extração das amostras de sedimentos sem o hormônio (branco).....	65
5.10.2.2. Extração das amostras fortificadas.....	66
5.10.2.3. Extração do hormônio das amostras dos sedimentos coletadas na piscicultura de Socorro.....	66
5.11. Degradação do hormônio em laboratório.....	67
5.12. Testes de ecotoxicidade do hormônio 17α-metiltestosterona.....	67
5.12.1. Cultivo e manutenção dos organismos-teste.....	67
5.12.2. Testes de reprodução para <i>Daphnia similis</i> e <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> e teste de reversão sexual da <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	69
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
6.1. Considerações gerais.....	73
6.2. Otimização das condições cromatográficas para a análise do 17α-metiltestosterona.....	74
6.3. Seleção do comprimento de onda utilizado em CLAE-UV.....	74
6.4. Condições cromatográficas para a determinação do hormônio 17α-metiltestosterona.....	75
6.5. Desenvolvimento da metodologia de extração do hormônio 17α-metiltestosterona das amostras de água.....	78
6.6. Validação da técnica analítica para a determinação do hormônio 17α-metiltestosterona nas amostras de água e de sedimentos.....	82
6.6.1. Linearidade da curva analítica a ser usada para a determinação do hormônio nas amostras ambientais.....	83
6.6.2. Sensibilidade da técnica analítica para a determinação do hormônio 17 α -metiltestosterona presente nas amostras de água e de sedimentos.....	84
6.6.3. Seletividade da técnica analítica para a determinação do hormônio 17 α -metiltestosterona presente nas amostras de água.....	84
6.6.4. Precisão e exatidão do método para a determinação do hormônio 17 α -metiltestosterona presente nas amostras de água.....	85
6.6.5. Limite de detecção e limite de quantificação determinados para as amostras de água.....	87
6.7. Avaliação do método de extração do hormônio 17α-metiltestosterona	

presente em amostras de sedimentos.....	88
6.7.1. Estudo da recuperação do hormônio 17 α -metiltestosterona presente nas amostras de sedimentos fortificadas: determinação do melhor solvente para a extração.....	88
6.7.2. Seletividade da análise do hormônio nas amostras de sedimentos.....	90
6.7.3. Precisão e exatidão para as extrações do hormônio 17 α -metiltestosterona das amostras de sedimentos.....	90
6.7.4. Limite de detecção e quantificação determinados para as amostras de sedimentos	92
6.8. Determinação do hormônio 17α-metiltestosterona em amostras de água.....	92
6.8.1. Utilização do método proposto para a determinação do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras de água de piscicultura.....	92
6.8.2. Parâmetros físicos e químicos da água dos tanques empregados para a coleta feita no mês de janeiro (primeira coleta).....	94
6.8.3. Quantificação do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras de água coletadas na piscicultura no mês de janeiro.....	96
6.8.3.1. Resultado da análise do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras de água do tanque 04.....	96
6.8.3.2. Resultado da análise do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras de água do tanque 05.....	97
6.8.3.3. Resultado da análise do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras de água do tanque 15.....	98
6.8.4. Parâmetros físicos e químicos da água dos tanques empregados para a coleta feita no mês de abril (segunda coleta).....	99
6.8.5. Quantificação do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras de água coletadas na piscicultura no mês de abril.....	101
6.8.5.1. Resultado da análise do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras de água do tanque 06.....	101
6.8.5.2. Resultado da análise do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras de água do tanque 09.....	102
6.8.5.3. Resultado da análise do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras de água do tanque 15.....	103
6.8.6. Comentários sobre a presença do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras de água de piscicultura.....	104
6.9. Determinação do hormônio 17α-metiltestosterona em amostras de sedimentos.....	107
6.9.1. Utilização do método proposto para a determinação do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras de sedimentos da piscicultura.....	107
6.9.2. Determinação da porcentagem de matéria orgânica dos sedimentos de piscicultura via calcinação (pesagem).....	107
6.9.3. Porcentagem de granulometria dos sedimentos coletados no rio Santa Maria do Leme e dos sedimentos coletados nos tanques da piscicultura (%).....	109
6.10. Utilização do método proposto para a determinação do hormônio nas	

amostras dos sedimentos.....	110
6.10.1. Quantificação do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras dos sedimentos coletados na piscicultura no mês de janeiro.....	112
6.10.1.1. Resultado da análise do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras dos sedimentos do tanque 04.....	112
6.10.1.2. Resultado da análise do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras dos sedimentos do tanque 05.....	113
6.10.1.3. Resultado da análise do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras dos sedimentos do tanque 15.....	114
6.10.2. Quantificação do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras dos sedimentos coletados na piscicultura no mês de abril.....	115
6.10.2.1. Resultado da análise do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras de sedimentos do tanque 06.....	115
6.10.2.2. Resultado da análise do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras de sedimentos do tanque 09.....	116
6.10.2.3. Resultado da análise do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras de sedimentos do tanque 15.....	117
6.11. Comentários sobre a presença do hormônio 17α-metiltestosterona nas amostras de sedimentos da piscicultura.....	118
6.12. Teste de degradação do hormônio 17α-metiltestosterona.....	119
6.13. Efeito do hormônio 17α-metiltestosterona no ambiente.....	121
6.14. Testes de ecotoxicidade.....	125
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	136
8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	139
9. TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS NO DECORRER DO DESENVOLVIMENTO DESTA PESQUISA.....	141
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	142
ANEXOS.....	153

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas.
- ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- CAQI- Central de Análises Químicas e Instrumentais.
- CLAE- Cromatografia líquida de alta eficiência.
- CNPq- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
- CONAMA- Conselho Nacional de Meio Ambiente.
- CRHEA- Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada.
- CV- Coeficiente de variação.
- C₁₈- Octadecilsilano.
- DES- Dietilestilbestrol.
- EAA- Esteróide anabólico androgênico.
- EESC- Escola de Engenharia de São Carlos.
- EFS- Extração em fase sólida.
- FDA- Food and Drug Administration.
- HNO₃- Ácido nítrico.
- H₂SO₄- Ácido sulfúrico.
- ICH- International Conference on Harmonization.
- INAD- Investigational New Animal.

- INMETRO- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial.
- IQSC- Instituto de Química de São Carlos.
- IUPAC- International Union of Pure and Applied Chemistry.
- LC/MS- Cromatografia líquida com detector de espectrometria de massas.
- LC/MS/MS- Cromatografia líquida com detector de espectrometria de massas/massas.
- LD- Limite de detecção.
- LQ- Limite de quantificação.
- OD- Oxigênio dissolvido.
- MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- MEC- Ministério da Educação e Cultura.
- MT- 17 α -metiltestosterona.
- NEEA- Núcleo de Estudos em Ecossistemas Aquáticos.
- pH- Potencial hidrogeniônico.
- ppm- partes por milhão.
- ppt- partes por trilhão.
- SPMD- Dispersão da matriz em fase sólida.
- SPME- Micro-extração em fase sólida.
- USP- Universidade de São Paulo.
- UV-Vis- Detector ultravioleta-visível.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	16
Figura 02: Estrutura da testosterona.....	19
Figura 03: Estrutura do 17 α - metiltestosterona.....	22
Figura 04: Cartucho empregado na EFS.....	26
Figura 05: Representação das etapas da EFS.....	26
Figura 06: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> (fêmea adulta)- Imagem capturada das culturas do laboratório de Ecotoxicologia do CRHEA-USP-São Carlos.....	49
Figura 07: <i>Daphnia similis</i> (fêmea adulta)- Imagem capturada das culturas do laboratório de Ecotoxicologia do CRHEA-USP-São Carlos.....	50
Figura 08: Localização dos compartimentos e municípios que compõem a bacia do rio Mogi-Guaçu. Trecho paulista.....	54
Figura 09 (A) e (B): Vista dos tanques de coleta da piscicultura no município de Socorro-SP.....	55
Figura 10: Vista do tanque 15 na piscicultura no município de Socorro-SP.....	55
Figura 11: Fluxograma de extração do hormônio das amostras de água da piscicultura.....	63
Figura 12: Fluxograma de extração do hormônio das amostras de sedimentos.....	65
Figura 13: Espectro de UV-Vis do hormônio 17 α -metiltestosterona.....	75
Figura 14: Cromatograma do padrão do hormônio 17 α -metiltestosterona na concentração 10 mg L ⁻¹ , utilizando como fase móvel acetoneitrila/água 35/65 (v/v), fluxo de 1,0 mL min ⁻¹ , injeção de 20 μ L, coluna C ₁₈ e comprimento de onda de 245 nm.....	78
Figura 15: Porcentagens de recuperação do hormônio no nível de fortificação de 1 mg L ⁻¹ , utilizando para extração cartuchos com volumes de 3,0 e 6,0 mL com 500 mg de adsorvente.....	79
Figura 16: Porcentagens de recuperação do hormônio no nível de fortificação de 1 mg L ⁻¹ versus solventes utilizados na extração.....	80
Figura 17: Tempo de secagem do adsorvente versus porcentagens de recuperação do hormônio no nível de fortificação de 1 mg L ⁻¹	81
Figura 18: Porcentagens de recuperação do hormônio no nível de fortificação de 1 mg L ⁻¹ versus volume de solvente utilizado para eluição.....	81
Figura 19: Curva analítica do hormônio 17 α -metiltestosterona.....	84
Figura 20: Cromatograma referente ao extrato do branco da água de nascente de piscicultura utilizando como fase móvel acetoneitrila/água 35:65 (v/v), fluxo de 1,0 mL min ⁻¹ , injeção de 20 μ L, coluna C ₁₈ e comprimento de onda de 245 nm.....	85

Figura 21: Porcentagem de recuperação do hormônio 17 α -metiltestosterona versus níveis de fortificação das amostras de água e média das fortificações.....	86
Figura 22: Recuperação versus solvente utilizado na extração do hormônio 17 α -metiltestosterona presente nas amostras de sedimentos.....	89
Figura 23: Cromatograma do branco dos sedimentos utilizando como fase móvel acetonitrila/água 35:65 (v/v), fluxo de 1,0 mL min ⁻¹ , injeção de 20 μ L, coluna C ₁₈ e comprimento de onda de 245 nm.....	90
Figura 24: Recuperação do hormônio 17 α -metiltestosterona versus nível de fortificação das amostras dos sedimentos.....	91
Figura 25: pH e oxigênio dissolvido da água dos tanques no momento da coleta.....	94
Figura 26: Condutividade e temperatura da água dos tanques no momento da coleta.....	94
Figura 27: Concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona encontrada nas amostras de água do tanque 04.....	97
Figura 28: Concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona encontrada nas amostras de água do tanque 05.....	98
Figura 29: Concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona encontrada nas amostras de água do tanque 15.....	98
Figura 30: pH e oxigênio dissolvido da água dos tanques no momento da coleta.....	100
Figura 31: Condutividade e temperatura da água dos tanques no momento da coleta.....	100
Figura 32: Concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona encontrada nas amostras de água do tanque 06.....	102
Figura 33: Concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona encontrada nas amostras de água do tanque 15.....	103
Figura 34: Cromatograma do hormônio presente nas amostras coletadas no tanque 06, no mês de abril, nesse caso foi feita a adição de padrão.....	104
Figura 35: Cromatograma referente ao extrato da ração de peixes com hormônio.....	106
Figura 36: Concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona encontrada nas amostras dos sedimentos do tanque 04.....	112
Figura 37: Concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona encontrada nas amostras dos sedimentos do tanque 05.....	113
Figura 38: Concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona encontrada nas amostras dos sedimentos do tanque 15.....	114
Figura 39: Concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona encontrada nas amostras dos sedimentos do tanque 06.....	115
Figura 40: Concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona encontrada nas amostras dos sedimentos do tanque 09.....	116
Figura 41: Concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona encontrada nas amostras dos sedimentos do tanque 15.....	117
Figura 42: Cromatograma do hormônio presente nas amostras dos sedimentos do tanque 04, da coleta feita no mês de janeiro. Nesse caso foi feita a adição de padrão.....	119
Figura 43: Cromatograma do padrão do hormônio na concentração de 10 mg L ⁻¹	

preparada na hora da injeção (1) e padrão do hormônio na
concentração de 10 mg L^{-1} degradada (2).....120

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Tanques onde foram coletados as amostras de água na piscicultura e as localidades dos pontos de coleta dentro dos tanques.....	57
Tabela 02: Tanques onde foram coletados os sedimentos da piscicultura e a localidade dos pontos de coleta dentro dos tanques.....	58
Tabela 03: Condições cromatográficas para a análise do hormônio 17 α -metiltestosterona.....	77
Tabela 04: Intervalo de concentração empregado para a determinação do hormônio 17 α -metiltestosterona, equação de regressão linear e coeficiente de correlação (r) do gráfico analítico (y= área cromatográfica e x= concentração).....	83
Tabela 05: Porcentagens de recuperação do hormônio 17 α -metiltestosterona de amostras de água coletadas no Rio Santa Maria do Leme em São Carlos para os três níveis de fortificação estudados.....	85
Tabela 06: Resultados da recuperação do hormônio 17 α -metiltestosterona presente nas amostras de sedimentos.....	91
Tabela 07: Resultados da concentração do hormônio nas amostras de água dos três tanques amostrados na coleta feita no mês de janeiro.....	99
Tabela 08: Resultados da concentração do hormônio nas amostras de água dos três tanques amostrados na coleta feita no mês de abril.....	104
Tabela 09: Porcentagem de matéria orgânica dos sedimentos dos tanques de piscicultura e dos sedimentos coletado para estudo de recuperação.....	108
Tabela 10: Porcentagem de granulometria dos sedimentos usados para os ensaios de recuperação e dos sedimentos dos tanques de piscicultura estudados (%).....	110
Tabela 11: Resultados da concentração do hormônio nas amostras de sedimentos dos três tanques amostrados na coleta feita no mês de janeiro.....	115
Tabela 12: Resultados da concentração do hormônio encontrado nas amostras de sedimentos dos três tanques amostrados na coleta feita no mês de abril.....	118
Tabela 13: Teste de toxicidade crônica de <i>Daphnia similis</i> em diferentes concentrações do hormônio nas quais os organismos-teste foram expostos.....	126
Tabela 14: Porcentagens de sobrevivência e números de neonatos obtidos no teste de toxicidade crônica com <i>Daphnia similis</i> nas soluções-teste e	

nos controles, e as variáveis físicas e químicas.....	127
Tabela 15: Porcentagens de sobrevivência e números de neonatos obtidos no teste de toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> nas soluções-teste e nos controles, e as variáveis físicas e químicas.....	128
Tabela 16: Neonatos da primeira, terceira e quarta cria de <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> que foram criados e avaliados quanto a sexualidade.....	130
Tabela 17: Neonatos de sexo indefinido que não tiveram cria em diferentes concentrações do hormônio 17 α -metiltestosterona, e número de fêmeas.....	130
Tabela 18: Teste de toxicidade crônica para avaliar a sobrevivência e reprodução da <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> em diferentes concentrações de etanol nas soluções-teste e no controle, e as variáveis físicas e químicas.....	133

RESUMO

FALONE, S. Z. (2007). DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DO HORMÔNIO 17 α -METILTESTOSTERONA EM AMOSTRAS DE ÁGUA E DE SEDIMENTOS DE PISCICULTURA : ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS COM CLADÓCEROS

Neste trabalho foi feito o desenvolvimento e validação de métodos para a determinação do hormônio 17 α -metiltestosterona em amostras de água e de sedimentos de uma piscicultura situada no município de Socorro-SP. O local de estudo foi escolhido porque no município de Socorro há um grande número de pisciculturas e também pelo fato da cidade fazer parte do Circuito das Águas. Toda a água utilizada no processo de reversão sexual das tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é descartada no Ribeirão dos Machados, um dos afluentes do rio Mogi-Guaçu, sem o devido tratamento. Foi desenvolvido o método analítico para a extração do hormônio das amostras de água, empregando a extração em fase sólida com adsorvente C18 (octadesilsilano). Também foi desenvolvido o método para a extração do hormônio das amostras dos sedimentos, empregando o equipamento de ultra-som. Foram feitos estudos de recuperação para as amostras de água e sedimentos em três níveis de fortificação. Empregou-se 300 mL da água de água de nascente (branco), e água do rio Santa Maria do Leme para os estudos de recuperação. Empregou-se 10 g de sedimentos (branco) coletados no rio Santa Maria do Leme, em São Carlos. Estas amostras foram fortificadas com o hormônio estudado. A técnica analítica

empregada para a determinação do hormônio foi a cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Vis e coluna RP-18. Para a determinação do hormônio foi utilizada a fase móvel acetonitrila/água 35:65 v/v. O volume injetado foi de 20 μL , o fluxo de 1,0 mL min^{-1} e comprimento de onda de 245 nm. Os resultados indicaram que os métodos desenvolvidos e validados se mostraram lineares, sensíveis, seletivos, precisos e exatos nas condições estabelecidas, com limites de detecção e de quantificação adequados para a análise do hormônio. A aplicação desses métodos só foi possível pela adição de padrão, que possibilitou a identificação e quantificação do hormônio nas amostras de água e de sedimentos. Foram também feitos testes de ecotoxicidade do hormônio empregando-se os organismos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii* para verificar a reprodução das espécies. Foram feitos testes para verificar a reversão sexual com a *Ceriodaphnia silvestrii*. Foi utilizado o programa computacional TOXSTAT 3.3 para a aplicação dos testes estatísticos com a *Daphnia similis*, pois os testes com a espécie *Ceriodaphnia silvestrii* não apresentou o número de 15 neonatos por organismo, não sendo possível a aplicação do referido teste. Verificou-se que não ocorreu reversão sexual nos testes com a *Ceriodaphnia silvestrii* nas concentrações estudadas (1,0 e 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). O estudo de avaliação e identificação de substâncias emergentes deve ser incorporado nos programas de controle e gestão de recursos hídricos, porque é importante verificar se o hormônio é responsável por algum tipo de toxicidade.

Palavras-chave: hormônio, água, sedimentos, ecotoxicidade.

ABSTRACT

FALONE, S. Z. (2007). DEVELOPMENT OF METHODS FOR THE DETERMINATION OF 17 α -METHYLTESTOSTERONE IN WATER AND SEDIMENTS SAMPLES FROM PISCICULTURE : ECOTOXICOLOGICAL ASSAY WITH CLADOCERA

In this work the development and validation of methods for the determination of 17 α -methyltestosterone hormone in water and sediments samples was achieved. The samples studied were extracted from pisciculture sites in the city of *Socorro, Sao Paulo State*. This place was chosen because it has a great number of pisciculture sites and is also localized near important tourist resources, known as the '*Circuito das Águas*'. One of the main concerns is the fact that water volumes used in the process of sexual reversion of the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*), are discarded without previous treatment in the *Machado* river, a tributary of Mogi-Guaçu river, the main water resource in this area. Therefore, there are evident potential threats and care must be taken to analyze the potential contamination of water resources in the neighborhood. Two analytical methods were developed to extract hormone from water and sediments samples: a) using solid phase extraction with sorbente C18; b) using ultrasonic facilities. The recovering of the water and sediments samples was made in three levels of fortification. To perform comparisons, standards were built using 300 mL water samples collected in safe places and samples of fortification in the Santa Maria do Leme river, in Sao Carlos,

and 10 g of sediments collected in the Santa Maria do Leme river, in Sao Carlos. These samples were contaminated with hormone under carefully controlled conditions. Hormone level determinations were carried out using HPLC with UV-Vis detector and column RP-18. The hormone determinations were made using the mobile phase acetonitrile/water 35:65 v/v. The experiments were carried out under the following conditions: a) the injected volume was 20 μL ; b) the flow speed was 1,0 mL min^{-1} ; c) a wavelength of 245 nm was used. The results obtained shows efficiency of the methods developed and validated in this as the correlations observed were linear, sensible, selective and accurate under the established conditions. Therefore, the experimental conditions used for detention and quantification were adequate for hormone analysis. Is worth to note that the identification and quantification of the hormone in the samples of water and sediments, is possibly only by making comparison with the standard discussed above. The organisms *Daphnia similis* and *Ceriodaphnia silvestrii* were also used to verify the ecotoxicity of the hormone, using reproduction of these species as the parameter to be monitored. Therefore, tests were made to verify the sexual reversion of *Ceriodaphnia silvestrii*. In these investigations, the computational program *TOXSTAT 3.3* was used to perform the statistical tests. Nevertheless, only the studies performed with the *Daphnia similis* had statistical means, as the tests with the *Ceriodaphnia silvestrii* species did not present statistical significance. Therefore, it was verified that *Ceriodaphnia silvestrii* in the conditions studied here (concentrations of 1,0 and 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) did not present evidences of sexual reversion. As a main conclusion, the present study demonstrates the need of incorporating the evaluation and identification of emergent substances in the protocols used for the control and management of water resources. Among the

concerns, special care must be taking to verify correlations between hormone and toxicity.

Keywords: hormone, water, sediments, ecotoxicity.

1. INTRODUÇÃO

Durante muitas décadas o homem produziu além de bens de consumo, inúmeros poluentes que, de uma forma ou outra, atingiram o meio ambiente.

Com a revolução industrial, aumentou a urgência de cuidar dos recursos naturais, e a sociedade passou a cobrar dos governantes maior responsabilidade para com os seres que habitam este Planeta. Surgindo, a partir de então, o processo de monitoramento ambiental, onde várias pesquisas vem sendo desenvolvidas para fornecer subsídios para as respostas que os pesquisadores precisam em relação ao meio ambiente.

O uso de produtos químicos data dos primórdios da civilização, entretanto no século XX, com a visão do Universo totalmente transformado pelas possibilidades que se apresentava pelo avanço tecnológico, a química era tida como uma ciência que transpunha todos os problemas do mundo moderno. Nesse ambiente de desenvolvimento industrial, principalmente nas últimas décadas, houve um crescimento desenfreado e desmedido na utilização de produtos químicos por conta dos benefícios que se pretendiam obter com os mesmos. Isso acarretou prejuízos tanto ao meio ambiente como à saúde do ser humano e dos animais em geral, pois muitos dos poluentes ambientais atuam diretamente no sistema endócrino dos seres vivos.

A atividade química é frequentemente relacionada, direta ou indiretamente, à maioria dos chamados “desastres ambientais”, embora outras atividades humanas também exerçam papel expressivo na degradação e poluição ambiental.

Nos últimos anos, foi identificada uma nova ameaça à saúde dos animais, e principalmente, dos seres humanos expostos às substâncias presentes no ambiente, como por exemplo, os hormônios sintéticos. Os hormônios fluem através da corrente sanguínea até seus órgãos-alvo, entre os quais encontram-se envolvidos na reprodução sexual. Estes produtos químicos sintéticos e também naturais podem afetar a saúde reprodutiva de organismos em geral, contribuindo para a infertilidade de diferentes maneiras e podendo ainda aumentar a taxa de câncer nos órgãos reprodutores. Grande parte do interesse dos cientistas relacionado ao uso de hormônios sintéticos foi despertado somente em 1996, com a publicação do livro *O Futuro Roubado de Theo Colborn* (COLBORN; DUMANOSKI; MYERS, 1997).

O hormônio 17α -metiltestosterona é um derivado sintético da testosterona, e é usado para a reversão sexual de tilápias geneticamente fêmeas para machos fenotipicamente. Este composto é encontrado no meio ambiente em níveis de partes por milhão (ppm). Os efeitos ambientais causados pelo hormônio 17α -metiltestosterona ainda são pouco conhecidos. Entretanto, alguns autores, como Budworth e Senger (1993); Gomeslsky et al. (1994); demonstraram em experimentos feitos em laboratório, que peixes não tratados com hormônios também apresentaram reversão sexual quando estes foram colocados em ambientes com recirculação de água de tanques com peixes que foram tratados com o hormônio.

Uma das principais ações no sentido de minimizar o impacto ambiental causado pelos resíduos gerados pela atividade de piscicultura, é o tratamento adequado dos mesmos. A remediação, embora apresente pouca vantagem para o meio ambiente se comparada com técnicas de redução na fonte, tem colaborado para diminuir a velocidade de contaminação de ambientes aquáticos.

Nos últimos anos, com uma nova visão da poluição ambiental, têm-se buscado alternativas que minimizem a produção de resíduos, em detrimento da preocupação exclusiva com o tratamento do resíduo no fim da produção.

A utilização de processos que se obtenha o mesmo resultado esperado com o 17α -metiltestosterona, mas que sejam menos agressivos ao meio ambiente é desejado, uma vez que o uso de hormônio sintético apresenta vantagens, como uma cultura monossexo, e desvantagens, como provocar a esterilidade, e ainda, quando aplicado em altas doses, torna-se uma fonte de poluição ambiental, tendo efeito sinérgico.

2. JUSTIFICATIVA

Uma das grandes preocupações atuais em termos de piscicultura é a qualidade da água de seus efluentes, pois em muitas regiões nenhum tratamento prévio ou mesmo manejo adequado é aplicado. Com o crescente aumento de estabelecimentos de pisciculturas é necessário desenvolver técnicas de manejo eficientes e que não degradem os recursos hídricos.

Com relação ao tratamento de água para abastecimento público, não existe legislação que mencione o hormônio 17α -metiltestosterona como sendo uma substância que deve ter o seu limite máximo na água, e os dados disponíveis na literatura são insuficientes. Sabe-se que o lançamento de substâncias hormonalmente ativas em corpos hídricos, mesmo em baixas concentrações, pode acarretar sérios impactos sobre a estrutura do ecossistema aquático, e possivelmente nos seres humanos que consomem esta água (REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006).

Diante deste cenário, fica claro a gravidade da situação dos recursos hídricos que recebem os efluentes de piscicultura, sendo necessário o monitoramento desses corpos d'água quanto à presença do hormônio 17α -metiltestosterona. A água não é somente uma herança de nossos predecessores, mas, sobretudo é, um empréstimo a nossos sucessores. Sua

proteção constitui uma necessidade vital, assim, como a obrigação moral do homem para com as gerações presentes e futuras.

Esta pesquisa teve como local de estudo uma piscicultura situada no município de Socorro, estado de São Paulo. Sabe-se que nos tanques que foram estudados é adicionado o hormônio 17α -metiltestosterona agregado ao alimento dos peixes, sendo portanto necessário determinar a concentração tanto na água, como nos sedimentos. É sabido que os efluentes dos tanques variam em termos de vazão e de concentração de nutrientes. Poucos efluentes permanecem constantes durante longos períodos de tempo, tornando-os por isso mais diluídos ou mais concentrados. Mas mesmo assim, o hormônio 17α -metiltestosterona continua ativo por algum tempo, além do fato de haver outra preocupação por parte da comunidade científica, já que a água onde os peixe passaram pela reversão sexual é descartada nos rios e pode ser consumida pela população, bem como os próprios peixes.

Este trabalho contribuiu para o entendimento da situação atual dos efluentes de piscicultura e que chegam até os rios. É importante mencionar, que a escolha da piscicultura em Socorro se deve ao fato de existir várias pisciculturas na região, e como essa região faz parte do Circuito das Águas (EXPLOREVALE, 2003), um grande número de pessoas utiliza a água dos rios que recebem os efluentes das pisciculturas.

Os trabalhos científicos existentes na literatura sobre o hormônio masculino 17α -metiltestosterona são sobre o seu isolamento em amostras de ração de peixes (MARWAH; MARWAH; LARDY, 2005), de determinação do hormônio na urina de boi (STOLKER et al., 1999), e de material recoberto com hormônio 17α -metiltestosterona (GONZALO-LUMBRERAS; IZQUIERDO-HORNILLOS,

2003), e do hormônio 17 α -metiltestosterona e de seus metabólitos de amostras de urina de eqüinos (McKINNEY, SUANN, STENHOUSE, 2007).

Existe também uma patente de extração de traços do hormônio 17 α -metiltestosterona de amostras de sangue de atletas, com resultados rápidos, simples e exatos, comparado com métodos convencionais descritos em farmacologias e farmacocinéticas (KOREA INSTITUTE SCIENCE & TECHNOLOGY, 2006), podendo ser usados em testes anti-doping.

Existem vários estudos sobre hormônios femininos em diferentes matrizes (ALDA; BARCELÓ, 2001a; GOMES et al.; 2004; THERON et al., 2004), mas Alda e Barceló (2001b) isolou os hormônios femininos estrógenos e progestógenos de água e sedimentos. Bila e Dezotti (2003) fizeram um trabalho de revisão, onde relatam que vários hormônios femininos foram encontrados em águas superficiais no Brasil.

Mas somente este trabalho fez o estudo de hormônios masculinos e desenvolvimento de métodos para determinação do hormônio 17 α -metiltestosterona em amostras de água e de sedimentos de piscicultura, sendo, portanto, inédito e pioneiro. Além de realizar também os ensaios ecotoxicológicos com Cladóceros.

Este estudo poderá servir de incentivo para novas pesquisas relacionadas ao hormônio 17 α -metiltestosterona. Além disso, os dados deste estudo poderão servir de base para os órgãos legisladores e de controle ambiental para a elaboração de leis que regulamentem limites máximos que possam ser encontrados na água, bem como a avaliação de risco frente à população que utiliza a água e consome os peixes, pois pouco se sabe sobre os efeitos e destino deste composto no meio ambiente.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Água como bem comum

A água é uma das substâncias mais simples, porém a mais importante. Todas as reações, que acontecem no nosso organismo, são em solução aquosa, e as proteínas, membranas e hormônios somente são funcionais na presença da água (MACÊDO, 2004).

A água é tão importante que os gregos antigos a consideravam como sendo um elemento fundamental da matéria. Por mais de 2000 anos ainda pensou-se que a água era um elemento; somente no século XVIII, é que experimentos evidenciaram que a água era um composto (MACÊDO, 2004).

A água é um constituinte fundamental da vida de todos os seres vivos da Terra, sendo utilizada em diversas atividades, como por exemplo: abastecimento doméstico e industrial, irrigação, pecuária, agricultura, preservação da flora e da fauna, recreação e lazer, geração de energia elétrica, navegação e outros (VON SPERLING, 1996).

Devido ao aumento da conscientização da população e aumento na rigidez das leis ambientais nos últimos anos vem se falando muito sobre a preservação dos recursos hídricos, com destaque para as águas de rios, lagos e reservatórios subterrâneos (GUARATINI; ZANONI, 2000).

A utilização do solo pelas atividades antrópicas, urbanização, agricultura, pecuária, aqüicultura, e outras, vêm ocasionando sérios problemas ambientais. As substâncias usadas na agricultura, na pecuária e na aqüicultura são lançadas nos rios, e podem ocasionar a contaminação de peixes, que acabam por servir de alimentação aos seres humanos, o que pode provocar sérios riscos à saúde. Também têm sido reconhecidos os impactos aos sistemas naturais. No entanto, essas atividades são de grande importância para o desenvolvimento econômico do país.

O diagnóstico dos ecossistemas, integrantes de uma bacia hidrográfica, assim como o funcionamento dos diferentes efeitos de uma perturbação causada por fontes antrópicas, é de grande relevância. Por meio deste diagnóstico é possível o uso de medidas adequadas de manejo de uma bacia hidrográfica, para uma efetiva minimização das perturbações nos sistemas fluviais decorrentes do uso do solo e da água.

Qualquer pessoa que esteja envolvida no desenvolvimento da aqüicultura, cientistas, extensionistas, produtores, administradores e governo, terão que entender que os recursos naturais só apresentarão todo o seu potencial de uso, em benefício da comunidade, se forem utilizados sob o ponto de vista da sustentabilidade do sistema. No entanto, para conseguir isso, todos os atores envolvidos na prática da aqüicultura deverão estar afinados entre si, trabalhando em cooperação mútua (SIGRH, 2001).

Atualmente, a exigência maior é a ISO 14000 aplicada à aqüicultura, o que significa produzir sem agredir o meio ambiente.

3.2. Aqüicultura

A prática da aqüicultura teve sua origem na China por volta do ano de 1000 a.C., difundindo-se rapidamente pela Indonésia, Vietnã e Camboja, sendo sua expansão provavelmente associada às pressões demográficas e à crescente necessidade de proteína animal para a alimentação humana. Na Europa, a piscicultura foi praticada inicialmente em mosteiros para a produção de peixes para o consumo próprio.

No continente americano a criação de peixes teve um verdadeiro impulso a partir do século XIX através da modernização dos meios de cultivo e da melhor aceitação deste tipo de alimentação por parte da população, determinando assim, a instalação da piscicultura industrial (HUET, 1978).

A agricultura e a agroindústria têm afetado o ambiente devido à ocupação e à fragmentação dos habitats naturais e originais pela redução da abundância e da diversidade da biota, com alterações físicas, químicas e biológicas do solo, como a erosão, poluição da água e da qualidade da paisagem, contribuindo para alterações climáticas globais (GRANZIERA, 2003).

A agricultura continua sendo a mais importante fonte econômica de países em desenvolvimento, e os manifestos ecológicos ressaltam a preocupação em analisar a relação custo-benefício das ações humanas envolvidas com as pesquisas para a avaliação dos impactos ambientais.

Com o surgimento de uma nova atividade agroindustrial, a aqüicultura, surgiu também grandes problemas ambientais, a destruição da mata ciliar, a utilização de praguicidas, hormônios e outros insumos. O manejo inadequado da aqüicultura propicia o aumento de nutrientes na água dos tanques de criação de peixes, promovendo a eutrofização artificial dos mesmos (ARANA, 2004;

MONTAGNOLLI et al., 2004), podendo contribuir no desencadeamento de problemas ambientais ou até mesmo de saúde pública (ARANA, 2004).

A técnica da piscicultura é definida como sendo a criação de peixes em tanques para o repovoamento de espécies com fins recreativos, ecológicos e para a alimentação. Geralmente, para a confecção dos tanques é feita uma escavação no solo e coloca-se grama como proteção lateral, ou são feitos de alvenaria. Os tanques apresentam pouca profundidade e fácil manuseio. Em sua construção, deve-se considerar principalmente a topografia do terreno e acima de tudo a disponibilidade de água de boa qualidade (HUET, 1978) e em abundância (GRANZIERA, 2003).

Se a água utilizada na piscicultura for poluída, o produtor vai comprometer a continuidade do cultivo. Para que isso não aconteça, ele pode investir financeiramente no restabelecimento da qualidade da água e, assim, continuar a sua produção (KUBTIZA, 1999). Porém, muitos produtores preferem mudar o empreendimento de lugar ao invés de ter gastos com o recurso hídrico que já foi poluído.

A piscicultura é um agronegócio que movimenta milhões de dólares todos os anos e vem despertando interesse nos produtores de todo o país. Esta atividade vem crescendo a cada ano pela boa aceitação de pescados no mercado externo, e também pelas condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento da piscicultura no Brasil (TACHIBANA et al., 2004; SOUZA et al., 2004).

Entretanto, a piscicultura tem despertado a atenção da comunidade científica pelos problemas ambientais gerados, mais especificamente no que se refere à poluição dos recursos hídricos que recebem seus efluentes, sendo que

esta água muitas vezes é destinada aos usos múltiplos requeridos pela sociedade, entre estes, o abastecimento público (MONTAGNOLLI et al., 2004).

A piscicultura nacional está concentrada nas regiões centro-oeste, sul e sudeste. Os Estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Goiás são os que mais se destacam. Somente os Estados de São Paulo e Paraná contribuem com mais de 60% da atividade pesqueira, sendo que o Estado de São Paulo contribui com mais de 45% de toda a produção de peixes de água doce do país (COELHO, 1997).

A piscicultura é dividida em três tipos: extensiva, intensiva e semi-extensiva. A piscicultura extensiva utiliza grandes reservatórios naturais ou artificiais, onde a densidade populacional de peixes é baixa e a sua alimentação e reprodução não é controlada.

A piscicultura intensiva utiliza tanques e reservatórios construídos para obter um máximo de peixes por unidade de área, neste caso, é controlada a alimentação e reprodução.

A piscicultura semi-extensiva tem um controle maior da alimentação e da reprodução, mas apenas complementando os meios naturais, além disso, aplicam a despesca que consiste na retirada do meio, apenas dos exemplares com tamanho próprios para o consumo.

São vários os exemplos de expansão e da integração de aqüicultura com outras atividades agropecuárias, turísticas e industriais nos últimos anos no Estado de São Paulo, como por exemplo, a piscicultura comercial intensiva em grande escala e as pisciculturas integradas às pequenas propriedades rurais, a criação de peixes em tanques rede nos grandes reservatórios das hidrelétricas

das bacias hidrográficas paulistas e os sistemas de pesque-pagues (CASTAGNOLLI; CYRINO, 1986).

Estudos mostraram que efluentes de piscicultura são freqüentemente concentrados em sólidos, matéria orgânica e nutrientes. A intensificação da produção piscícola aumenta a concentração de gás carbônico, amônia, sólidos fecais e matéria orgânica dissolvida na água. Além dos contaminantes produzidos pelos processos naturais e pela presença de nutrientes como fezes e ração não consumida, a piscicultura lança os resíduos de produtos químicos, os quais são utilizados na desinfecção, controle de doenças, anestésicos para transportes e hormônios para induzir a reprodução e reversão sexual (BOYD; QUEIROZ, 1997).

Se a velocidade de excreção do hormônio por parte dos organismos for baixa, ou se a molécula do mesmo não for metabolizada, haverá acúmulo deste no organismo, e sendo este solúvel na fase gordurosa ou se for sorvido por outros constituintes do organismo, sua concentração final poderá ser maior do que a concentração a que esteve exposto (BOYD; QUEIROZ, 1997).

Os microrganismos da comunidade planctônica também podem acumular rapidamente quantidades significativas de hormônios do meio aquoso e retê-los em seus tecidos, afetando diretamente os seres humanos que se alimentam de peixes, em processos de bioacumulação por ingestão de microrganismos, plâncton, ou detritos da superfície dos sedimentos, dependendo das características de cada espécie de peixe (McFARLAND; CLARK, 1989).

Portanto, por mais que existam estudos demonstrando a não acumulação do hormônio 17α -metiltestosterona nos tecidos dos peixes, e que são rapidamente metabolizados (ROTHBARD et al., 1990; CURTIS et al., 1991; PANDIAN; SHEELA, 1995), existe a possibilidade de que esses hormônios sejam

liberados no meio ambiente e causem problemas de saúde nos consumidores (BEARDMORE; MAIR; LEWIS, 2001; KARAYÜCEL et al., 2003).

Não há estudos de longa duração que avaliem o impacto da aqüicultura nas bacias hidrográficas, já que a água utilizada nos tanques são preferencialmente de nascentes e depois de usadas, são introduzidas nos rios podendo levar consigo principalmente o hormônio 17 α -metiltestosterona, dentre outros. Portanto, é necessário estudos mais rigorosos para que se saiba os níveis desses poluentes e sua principal consequência e, também dessa forma, os produtores poderão tomar medidas para o desenvolvimento sustentável de suas criações, reduzindo a quantidade de poluentes e, os órgãos competentes terão parâmetros para realizarem a fiscalização.

Nota-se que nos últimos anos um aumento no consumo de peixes pela população mundial, devido à busca por hábitos alimentares saudáveis, já que os peixes na dieta alimentar fornecem nutrientes como proteínas com alto valor nutritivo e baixas taxas de colesterol (BARDACH; RYTHER; McLARNEY, 1972). Por isso, observa-se que a piscicultura foi o ramo da agropecuária que mais cresceu nos últimos anos em todo o mundo, em torno de 10% ao ano, triplicando a produção global de pescados desde 1984 (EL-SAYED, 1999; PEZZATO; SCORVO FILHO, 2000).

O Brasil está entre os países com grande potencial para a piscicultura, pois possui um vasto território e condições climáticas favoráveis para a produção de peixes de água doce. Esse potencial deve ser aproveitado, já que o estoque de peixes naturais está se esgotando devido à exploração predatória e destruição dos habitats naturais. A produção de peixes economicamente viáveis no Brasil, como a tilápia do Nilo, segue padrões de cultivo intensivo (FALONE et al., 2006).

No cultivo intensivo, a densidade populacional é sempre elevada e isso torna a população de peixes susceptíveis às doenças, podendo limitar o desenvolvimento de cultivos de média e grande escala (VENDEMIATTI, COSTA, CYRINO, 2003).

A maturação sexual dos peixes está ligada a muitos fatores biológicos, como o comportamento, as diferenças entre as taxas de crescimento, coloração corpórea, forma entre os espécimes machos e fêmeas. Assim, alguns fatores como as alterações no metabolismo, ganho ou perda de peso, facilidade em adquirir doenças ou baixa qualidade da carne estão relacionadas à maturação sexual. Geralmente cerca de 30% dos machos de tilápia, atingem a maturidade sexual no primeiro ano de vida, e as fêmeas no segundo ano (COELHO, 1997).

A reversão sexual de peixes geneticamente fêmeas para machos fenotípicos é obtida com sucesso em diversas espécies de peixes, sendo que a espécie tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) tem sido considerada a mais importante para as condições de cultivo (BOMBARDELLI et al., 2004) com o uso de hormônios sintéticos de baixo custo e fácil manejo.

A técnica da reversão sexual é de grande importância no cultivo das tilápias devido à necessidade de se obter indivíduos machos para a engorda, evitando dessa maneira gastos energéticos com a cópula e desova. O desenvolvimento dos machos é mais acelerado quando comparado às fêmeas (TEICHERT-CODDINGTON; MANNING; EYA, 2000).

O excesso populacional nos viveiros de criação aumenta a competição por alimentos e prejudica a qualidade da água no ambiente, e reduzindo o crescimento dos peixes (TOYAMA, CORRENTE, CYRINO, 2000), e também tem

o fato de que as fêmeas não se alimentam durante o período de incubação oral dos alevinos (BORGES et al., 2005).

3.3. Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Na história da humanidade existem registros da ocorrência de tilápias em pinturas egípcias de 2500 a.C. Criações de tilápias para consumo humano teve início no Quênia em 1924, expandindo-se pelo Congo em 1937. Depois desse período, soldados japoneses introduziram a *Oreochromis mossambicus* na Ilha de Java e dessa forma a tilápia se popularizou na Indonésia e Filipinas. Alcançando, dessa forma, grande projeção de cultivo e desenvolvimento em águas tropicais após a Segunda Guerra Mundial.

No Brasil, a espécie foi introduzida em 1971 e em São Paulo foi introduzida em 1974. A tilápia do Nilo encontra-se disseminada por todo o Brasil, desde a bacia do Rio Amazonas até o Rio Grande do Sul (BOSCOLO et al., 2001).

A Tilápia do Nilo é uma espécie de peixe tipicamente tropical, rústica, possuidora de grande capacidade de adaptação aos mais variados climas, pouco suscetível a doenças, possui carne de fino paladar, destacando-se pelo fácil manejo, características que possibilitam sua criação mesmo em pequenas quantidades de água.

A espécie possui corpo alto e curto, cabeça e cauda pequenas, cujas fêmeas desovam em ninhos e incubam seus ovos e desenvolvem suas larvas na cavidade bucal (GALLI, 1981). Devido ao fato da incubação ser oral, a tilápia do Nilo apresenta bom índice de sobrevivência, mesmo na presença de predadores,

o que torna em pouco tempo os açudes superpovoados, reduzindo e paralisando o crescimento dos indivíduos por falta de alimento e espaço vital.

A tilápia do Nilo é uma espécie muito prolífera, cujo início da reprodução varia dos quatro aos seis meses, dependendo do desenvolvimento corporal; apresenta várias desovas parciais no decorrer do ano e, em condições naturais, quando a temperatura da água permanece elevada, acima de 24°C, pode desovar em intervalos prováveis de sessenta dias. Sobrevive numa variação de temperatura de 11°C a 42°C.

O número de alevinos varia de 100 a 500 por desova (GALLI, 1981), e em condições de tanque cresce de 2 a 3 gramas por dia, atingindo até 2,5 quilos.

A tilápia é criada em diversos sistemas, como em cultivos intensivos em tanques-rede e “raceways”, que são tanques supridos com um grande fluxo de água (KUBITZA, 1999). Acredita-se que no Brasil, metade da produção anual de peixes cultivados seja de tilápias (BOSCOLO et al., 2001).

A tilápia do Nilo é um peixe exótico cultivado no Brasil, de escamas, oriundo do continente Africano e é facilmente reconhecido pelas listras verticais da cauda (HEPHER; PRUGININ, 1981). A Figura 01 apresenta a tilápia do Nilo.

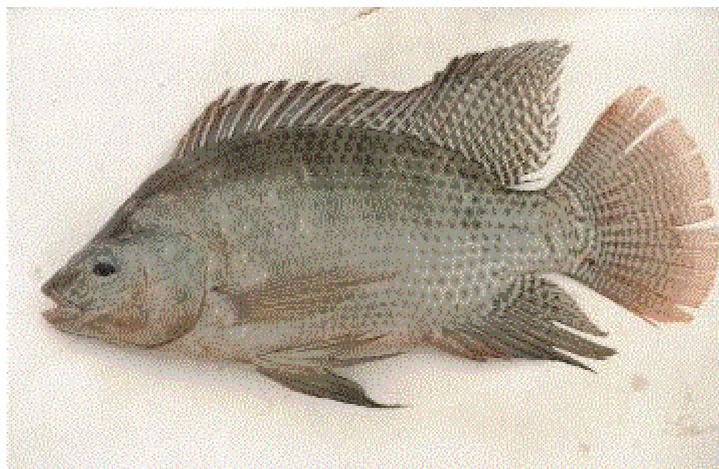


Figura 01: Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (PEIXEVITAL, 2006).

A proliferação da tilápia do Nilo é considerada como sendo o principal problema para o seu cultivo. Acasalam em média aos cinco meses de idade, com desovas múltiplas durante o ano, esta precocidade sexual e a alta viabilidade de larvas provocam uma superpopulação com peixes de pequeno tamanho, o que implica num excesso de indivíduos por unidade de área. Para evitar este tipo de problema são utilizados hormônios sintéticos para se ter uma cultura monossexo, sendo que neste caso, o interesse econômico é sobre os machos da cultura, pois crescem de duas a três vezes mais que as fêmeas, em um mesmo período de tempo. Por isso, utilizam-se hormônios sintéticos andrógenos.

3.4. Hormônios

Recentemente foi identificada uma nova ameaça à saúde do mundo animal e dos seres humanos expostos a produtos orgânicos sintéticos presentes no ambiente. Certos compostos afetam a reprodução de organismos superiores, contribuindo para a infertilidade de várias maneiras e podendo ainda aumentar a taxa de câncer nos órgãos reprodutores (COLBORN; DUMANOSKI; MYERS, 1997).

Os hormônios, que são os produtos químicos sintéticos interferem no sistema do organismo que trabalha baseado na transmissão de mensageiros químicos em níveis de parte por trilhão (ppt). Os hormônios encontram-se envolvidos na reprodução sexual tanto de homens quanto de mulheres (BAIRD, 2002), agem como uma espécie de mensageiros, promovendo a comunicação entre diferentes partes do organismo.

Hormônios são substâncias químicas produzidas no organismo e que têm o efeito específico, regulando ou alterando determinado órgão ou função. De

acordo com as aplicações terapêuticas, os hormônios têm basicamente duas funções: metabólica e androgênica. Os androgênios apresentam-se geralmente na forma de pó-cristalino na coloração branca, inodoros, insípidos, pouco solúveis ou quase insolúveis em água (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1976).

Como agem em órgãos diferentes de onde são produzidos, os hormônios naturais têm um receptor específico no seu local de atuação, que é a forma do organismo reconhecer a substância, uma espécie de mecanismo de chave e fechadura. Assim, para cada hormônio, há receptores que o reconhecem em que ele se encaixa para ser absorvido e agir no local específico (COLBORN; DUMANOSKI; MYERS, 1997).

Mas, os hormônios não existem somente em seres humanos, eles estão presentes na natureza tanto em outros animais como nos vegetais. Entre os vertebrados, há bastante semelhança entre os hormônios existentes nas diversas espécies tanto em sua forma quanto em sua função. Nos vegetais, embora tenham outra estrutura e outras funções, o mecanismo pelo qual eles atuam é semelhante. Esta é a razão pela qual uma substância que interfere no mecanismo de ação hormonal pode atuar alterando o desenvolvimento, reprodução e funções de seres vivos de diversas espécies a ela expostos.

A testosterona é um hormônio masculino e sua produção diária nos seres humanos é de 2,5 a 11,0 miligramas (SILVA; DANIELSKI; CZEPIELEWSKI, 2002), seu uso terapêutico é no desenvolvimento ou manutenção das características sexuais secundárias e em outras funções fisiológicas, como em homens com deficiência de androgênios (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1976).

A Figura 02 apresenta a estrutura do androgênio testosterona.

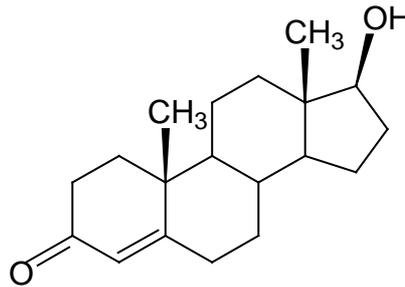


Figura 02: Estrutura da testosterona.

As células de Leydig são responsáveis pela produção do hormônio testosterona, que é necessário tanto à espermatogênese normal como também ao desenvolvimento de todo o aparelho reprodutor masculino. A produção da testosterona ocorre durante a puberdade. No sexo feminino, é produzida pelos ovários em pequena quantidade (SILVA; DANIELSKI; CZEPIELEWSKI, 2002).

A testosterona é rapidamente metabolizada no fígado se administrada por via oral. A meia-vida da testosterona é de 10-21 minutos. Ela é inativa no fígado pela conversão em androstenediona e 90% de seus metabólitos ou forma conjugada são excretados através da urina (RANG; DALE; RITTER, 1997).

Segundo Korolkovas e Burckhalter (1976), a testosterona por ser rapidamente metabolizada quando administrada por via oral, tem ação curta se aplicada por meio de injeção intramuscular, e ação prolongada, quando administrada por implantação subcutânea.

A partir da testosterona foi desenvolvido o primeiro derivado sintético, o 17α -metiltestosterona, que foi utilizado durante a Segunda Grande Guerra para causar maior agressividade e motivação aos soldados durante as batalhas (LISE et al., 1999).

3.4.1. 17 α -metiltestosterona

O hormônio 17 α -metiltestosterona é um exógeno, anabólico esteróide ativo quando administrado por via oral, e tem atividade androgênica menor do que a testosterona (VICK, 1999).

O hormônio 17 α -metiltestosterona é um esteróide sintético (DUARTE; SILVA; MEIRELLES, 2002), derivado da testosterona (GONZALO-LUMBRELAS; IZQUIERDO-HORNILLOS, 2003), bem conhecido na Korea como um disruptor endócrino (PARK, 2005), pois age como agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, recepção, ação ou eliminação dos hormônios naturais do corpo. São responsáveis pelo equilíbrio de fatores internos do organismo, reprodução, desenvolvimento e comportamento nos seres humanos (USEPA, 1998; OLEA-SERRANO, 2002).

A freqüente exposição ao composto 17 α -metiltestosterona, mesmo em baixas concentrações, na ordem de ng L⁻¹, age como um disruptor endócrino em gastrópodos. Este hormônio pode ocasionar impossexo, que consiste no aparecimento de características sexuais masculinas, como pênis em indivíduos do sexo feminino, e redução da fecundidade e espermatogênese em alguns gastrópodos (PARK, 2005).

Na administração oral do 17 α -metiltestosterona em seres humanos, os níveis máximos na corrente sanguínea são atingidos entre 1,5 e 2 horas e a meia-vida é de 2,5 a 3 horas sugerindo em caso de tratamento, várias doses diárias são necessárias para manter um nível de ação terapêutica do esteróide (URONEWS, 2000).

O hormônio 17 α -metiltestosterona é usado na medicina para tratamento de câncer de mama, sarcopenias, que é a perda degenerativa de massa e força

nos músculos, hipogonadismo, que é uma diminuição das funções dos testículos, e osteoporose. Também é usado em pacientes com deficiência andrógênica e infertilidade (URONEWS, 2000; RIVERA-ARCE et al., 2006). Em atletas que praticam esportes, o uso do hormônio 17α -metiltestosterona é proibido (DE ROSE et al., 2004).

Os estereóides anabólicos androgênicos (EAA) podem causar diversos efeitos colaterais, como psicopatologias, câncer de próstata, doença coronariana, esterilidade e também promovem a agressividade e a motivação (SILVA; DANIELSKI; CZEPIELEWSKI, 2002).

Entre os efeitos adversos dos androgênicos e esteróides anabólicos sobressaem-se os seguintes: virilismo nas crianças pré-púberes; danos hepáticos, hipercalcemia nas mulheres com carcinoma mamário disseminado, retenção de sódio e água, o que pode ocasionar edema e fechamento das epífises, também pode reduzir a altura que uma criança atingirá quando adulta (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1976). O esteróide administrado 17α -metiltestosterona pode ser cancerígenos e/ou provocar efeitos adversos nos seres vivos (PANDIAN; SHEELA, 1995).

Em animais, o hormônio 17α -metiltestosterona, é absorvido pelo sistema circulatório logo após a administração oral. A toxicidade aguda do hormônio 17α -metiltestosterona é baixa, mas a maioria dos efeitos adversos associados ao seu uso ocorrem logo após a administração de altas doses. Em seres humanos, o primeiro órgão a sofrer toxicidade crônica é o fígado (VICK, 1999).

O hormônio é utilizado para tratamento do câncer de mama de mulheres na dosagem de 250 mg dia^{-1} , sendo que para uso medicinal o normal é a dose de $10-80 \text{ mg dia}^{-1}$. Nos homens é usado para tratamento de espermatogênese

imperfeita, hipertrofia prostática e impotência. Entretanto, seu uso é limitado, porque pode produzir efeitos adversos nos seres humanos (VICK, 1999).

A concentração do 17α -metiltestosterona de 10 a 40 mg kg⁻¹ na ração, produz 100% de machos de peixes em água recirculada, ou seja, a água que foi descartada do processo de reversão sexual que volta ao local da reversão sexual (TEICHERT-CODDINGTON; MANNING; EYA, 2000).

Além de todos os efeitos do 17α -metiltestosterona já mencionados, o hormônio pode transformar-se em estrogênio, por meio do processo chamado aromatase, que é a transformação do hormônio andrógeno em estrógeno, e dessa forma, causar efeitos acentuados, desregulando todo o sistema hormonal dos seres humanos e animais.

A Figura 03 apresenta a estrutura do 17α -metiltestosterona.

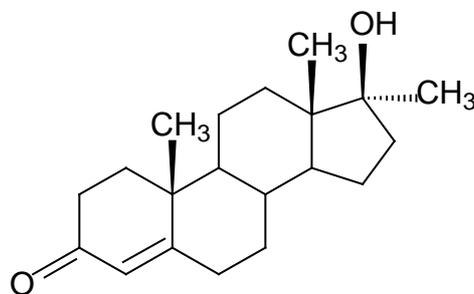


Figura 03: Estrutura do 17α - metiltestosterona.

O hormônio 17α -metiltestosterona tem massa molar de 302,44 g mol⁻¹, é solúvel em álcool, metanol, éter e outros solventes orgânicos, praticamente insolúvel na água, e seu ponto de fusão é de 161-166°C (WEAST, 1988).

O uso do androgênio 17α -metiltestosterona na reversão sexual de peixes vem crescendo nos últimos anos. A técnica de controle da sexualidade em peixes apresenta um grande potencial para aumentar a produtividade nos cultivos, pois

permitted to obtain the benefits associated with sex through morphological, physiological or behavioral characteristics of economic interest.

Among the hormones used for sex reversal in fish, 17α -methyltestosterone has been the most employed, because it also has the advantage of being easily excreted soon after the hormonal treatment (MAINARDES-PINTO et al., 2000).

About 99% of the compound is metabolized and released in a few days, but a large number of applications can provoke a synergistic effect in aquaculture and lead to an environmental pollution problem (PANDIAN; SHEELA, 1995).

The administration of the hormone 17α -methyltestosterone can be done in various ways, but, for commercial purposes, the process of administration must be practical, being the most recommended the vehicle of the hormone through the feed or through immersion baths. When the hormone is added to the feed, it can be a more interesting technique from the point of view of environmental pollution, because it uses a smaller quantity for the same population of juveniles (BOMBARDELLI et al., 2004).

3.5. Hormônios e legislação

With all the benefits cited in relation to the sex reversal technique, there is also an environmental concern on the part of the scientific community, or rather, a certain quantity of this hormone can be reaching the rivers and with this it can occur environmental imbalance, once that in any animal species, the relationship between male and female is an important factor in reproduction.

A importância do estudo do hormônio 17α -metiltestosterona está no fato de que o hormônio pode afetar adversamente o sistema reprodutivo de organismos aquáticos como, por exemplo, a masculinização de peixes fêmeas em rios contaminados com o descarte das águas de pisciculturas.

A portaria 518 de 25/03/2004 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004) que trata dos padrões de potabilidade da água e a resolução CONAMA 357 de 17/03/2005 que classifica as águas em todo o território nacional, tratam da qualidade da água, mas não citam os hormônios como contaminantes passivos de controle. Uma vez que não existem leis e nem portarias com limites máximos permitidos para este composto nos recursos hídricos, torna-se necessário o monitoramento desse composto na água e nos sedimentos de regiões onde há pisciculturas.

O hormônio 17α -metiltestosterona aumenta artificialmente o desempenho de atletas, não levando em consideração a saúde do mesmo e é antagônico aos princípios do jogo limpo (DE ROSE et al., 2004), isto, segundo os critérios da Portaria 531, de 10 de julho de 1985, do MEC e, segundo a legislação internacional (LISE et al., 1999).

Para se obter este produto em farmácia, é necessário um receituário em duas vias, segundo a Portaria 344, de 12 de maio de 1998 (LISE et al., 1999).

Bila e Dezotti (2003), fizeram um estudo sobre fármacos no Brasil, mas o 17α -metiltestosterona não foi estudado, dando enfoque somente para hormônios femininos.

O DES (dietilestilbestrol) é o único hormônio que tem seu uso proibido em todos os países, devido ao seu efeito carcinogênico (DUARTE; SILVA; MEIRELLES, 2002).

Então, diante dessa realidade e de tantos problemas que possam surgir, existe uma preocupação no desenvolvimento de métodos analíticos suficientemente sensíveis para a determinação e a quantificação desses compostos em amostras ambientais. Neste estudo foram empregadas a extração em fase sólida e o equipamento de ultra-som para a extração do hormônio das amostras de água e de sedimentos, e a cromatografia líquida de alta eficiência como técnica analítica.

3.6. Métodos de extração e técnica analítica empregada na determinação de resíduos de hormônio em amostras de água e de sedimentos

3.6.1. Extração em fase sólida (EFS)

A extração em fase sólida é utilizada para isolar um ou mais analitos presentes em amostras complexas, antes de se fazer a análise utilizando a técnica da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Neste estudo foram utilizados cartuchos com fase estacionária de sílica gel quimicamente ligada ao grupo orgânico apolar C₁₈. Os cartuchos são seringas de polipropileno, que contém material de empacotamento entre dois discos de polietileno (frits). A parte inferior do cartucho é acoplada em uma cuba coletora de amostra onde é efetuado vácuo. Dessa forma, os analitos não polares ficam retidos na fase sólida não polar, enquanto as impurezas que são polares, são eluídas. Como eluente para os analitos, costuma-se utilizar vários solventes polares ou uma mistura deles em diferentes proporções (LANÇAS, 2004a).

As Figuras 04 e 05 apresentam as principais etapas envolvidas em EFS.

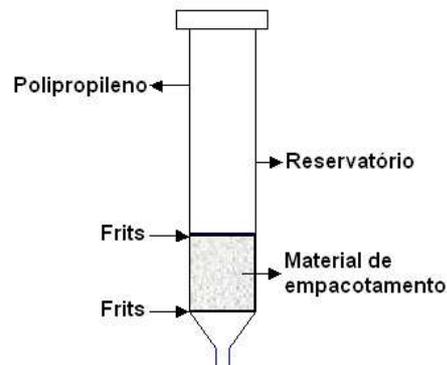


Figura 04: Cartucho empregado na EFS.

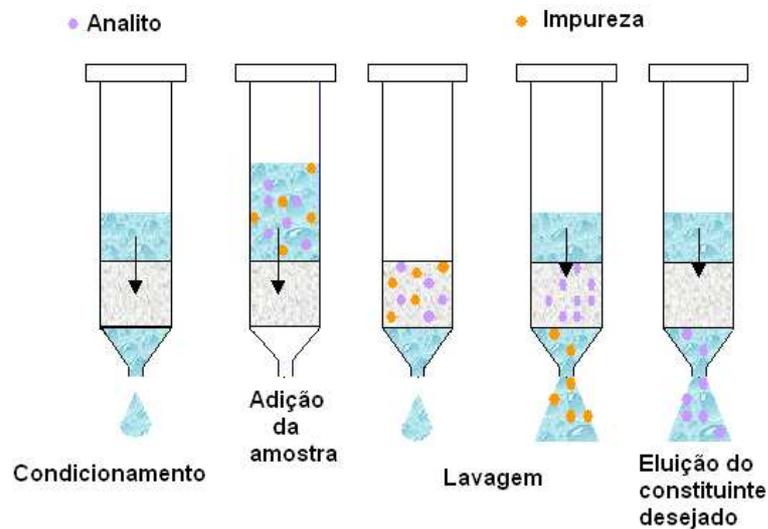


Figura 05: Representação das etapas da EFS.

As principais etapas da EFS são:

Condicionamento do adsorvente: A fase estacionária é lavada inicialmente com metanol, para diminuir a tensão superficial e aumentar a superfície de contato com a solução aquosa a ser analisada. Após a lavagem com metanol se retira o excesso utilizando água ultrapura.

Adição da amostra: Transferência da amostra de água a ser analisada quantitativamente.

Lavagem: Adição do eluente para eliminar interferentes.

Eluição: Adição quantitativa de eluente para extrair os analitos que ficaram retidos na fase estacionária. Tomando cuidado na escolha do solvente utilizado para não carregar impurezas que possam não ter sido eliminadas na etapa anterior (LANÇAS, 2004a).

Este procedimento foi feito para a extração do hormônio das amostras de água, entretanto para a extração dos sedimentos, foi utilizado o ultra-som.

3.6.2. Ultra-som

O ultra-som foi utilizado como método para extrair o hormônio das amostras dos sedimentos, esse procedimento foi desenvolvido seguindo o exemplo do procedimento de extração de pesticidas de solos (BABIC, PETROVIC, KASTELAN-MACAN, 1998).

Após realizar as extrações do hormônio das matrizes água e sedimentos, utilizou-se a cromatografia líquida de alta eficiência como técnica analítica para a quantificação do hormônio 17 α -metiltestosterona, por ser sensível na identificação e quantificação do hormônio em estudo.

3.6.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida é uma importante técnica analítica de separação, por ser bem sensível, de fácil quantificação, por sua adequação para espécies não-voláteis ou termicamente instáveis, e além de tudo, pela sua ampla aplicabilidade (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002), praticamente não há restrição quanto à natureza da amostra a analisar (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000).

A técnica de CLAE utiliza colunas recheadas com partículas de pequeno tamanho, necessárias para se obter uma alta resolução, no entanto apresentam

uma grande resistência à fluxo da fase móvel, sendo por isso, mantidas por uma ou mais bombas de alta pressão (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006). O fluxo da fase móvel é facilmente controlado, garantindo assim, uma boa reprodutibilidade das injeções e conseqüentemente análises mais precisas. As amostras são injetadas no aparelho com o auxílio de microsseringas.

Vários tipos de detectores podem ser colocados na saída da coluna, proporcionando um registro contínuo da composição do eluente (GUIMARÃES, 1987), sendo que o detector de absorção no UV-Visível é o mais comum (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; HARRIS, 2001).

O emprego da cromatografia líquida para solucionar problemas analíticos, necessita da combinação correta das condições experimentais, como: tipo de coluna, fase móvel, temperatura, quantidade de amostra injetada e do detector específico para cada caso (CIOLA, 1998).

Na cromatografia de modo normal, a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, enquanto que no modo reverso, a fase móvel é mais polar que a fase estacionária. A cromatografia em modo reverso é o mais utilizado em CLAE, por permitir uma grande variedade de separação de solutos e o uso de fases móveis aquosas. A fase móvel mais utilizada é a mistura acetonitrila-água, sendo que a acetonitrila é substituída, quando necessário, por metanol (HARRIS, 2001).

O princípio de separação em fase reversa é a hidrofobia, havendo interação entre a parte não-polar do soluto e a fase estacionária, sendo que uma maior interação acontece quando se aumenta a quantidade de água na fase móvel (CASS; DEGANI, 2001).

O bombeamento da fase móvel pode operar em dois modos: isocrático e gradiente. No modo isocrático a porcentagem de solvente permanece constante

durante todo o tempo de análise, o que torna o sistema capaz de separar um número limitado de picos, e no modo gradiente, a composição da fase móvel varia durante a análise, o que possibilita uma análise com picos bem resolvidos (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000).

Os principais componentes de um cromatógrafo em fase líquida são: reservatório da fase móvel, sistema de bombeamento, regulador de pressão, válvula de injeção, coluna, detector e um sistema de aquisição de dados (CASS; DEGANI, 2001; McNAIR; GALHIANE; LANÇAS, 1985).

A cromatografia líquida de alta eficiência requer que a amostra seja solúvel na fase móvel e não seja decomposta quando solubilizada, para que possa ser transportada através da coluna sem que seus componentes se modifiquem, e a fase móvel deve ter alta pureza, preferencialmente o solvente deve ser de grau cromatográfico (GUIMARÃES, 1987).

A cromatografia é uma técnica utilizada para separar compostos como corantes polares, isômeros, fármacos e outros, entre eles, os hormônios (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

Entretanto, antes de se iniciar o desenvolvimento de um método e aplicar a técnica analítica, deve-se fazer a validação do mesmo e avaliar se o método é eficiente ou não. Segundo Leite (1996):

“Não ter validação é ter apenas um número e não um resultado”.

3.7. Validação da metodologia para determinação do hormônio 17 α -metiltestosterona em amostras de água e de sedimentos

Uma etapa muito importante e relevante no campo de pesquisas na área de resíduos de poluentes ambientais é a escolha do método a ser utilizado. Tendo

o foco do trabalho voltado para a confiabilidade analítica do mesmo, baseado em adaptações mais modernas de antigos métodos, no uso de novos equipamentos ou ainda de novas técnicas (LEITE, 1996). A validação é um processo que fornece uma evidência documentada de que o método é confiável ao que se aplica (CASS; DEGANI, 2001).

É importante lembrar que não existe um modelo pronto para sistemas de validação, é preciso ajustar e adequar às melhores adaptações (LEITE, 1996; CASS; DEGANI, 2001).

No Brasil, há três agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios; a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) (OLIVARES, 2006). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, tais como a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003, o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março de 2003 e a Instrução Normativa nº 46 de 10 de junho de 2003. (INMETRO, 2003; ANVISA, 2003, MAPA, 2003).

É possível distinguir dois tipos de validação de métodos: o primeiro é denominado validação no laboratório “*in house validation*”, onde as etapas de validação são feitas em um único laboratório, seja para validar se um método novo tem sido desenvolvido adequadamente, ou para verificar se um método adaptado de outras fontes está apropriado.

O segundo tipo é a validação completa “*full validation*”, e envolve todas as características de desempenho de um estudo interlaboratorial utilizado para verificar como uma metodologia se comporta em uma determinada matriz em

vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza associada à metodologia como um todo (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

São exigidos alguns requisitos para a validação de métodos, entre eles pode-se destacar: a seletividade, sensibilidade, linearidade, recuperação, exatidão, precisão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) (LANÇAS, 2004b; ANVISA, 2003; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; INMETRO, 2003).

Dependendo do experimento, deve-se avaliar quais destes critérios é o de maior relevância para se obter o melhor processo de validação, pois nem sempre é necessário levar em consideração todos os critérios (VAN ZONEN et al., 1999). Portanto, os parâmetros de validação devem ser baseados na intenção do uso do método analítico que se quer usar (AMARANTE JUNIOR et al., 2001). Dessa forma, os experimentos podem ser limitados para o que realmente é necessário (RIBANI et al., 2004).

3.7.1. Linearidade e faixa de aplicação

Linearidade é a capacidade de um método analítico em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma faixa de aplicação (INMETRO, 2003; CASS; DEGANI, 2001, LANÇAS, 2004b; ANVISA, 2003), sendo possível relacionar o sinal do detector com a concentração do analito presente na amostra (CASS; DEGANI, 2001). A linearidade é avaliada por intermédio de medidas da amostra em diversas concentrações utilizando a curva analítica (CASS; DEGANI, 2001). Busca-se, geralmente, uma relação linear entre a concentração ou quantidade e

sinal analítico, embora as relações não-lineares também são aceitas (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medidas experimentais pode ser efetuada usando o método matemático da regressão linear. Além dos coeficientes de regressão \underline{a} e \underline{b} , também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação \underline{r} (CHUI; ZUCCHINI; LICHTIG, 2001).

Este coeficiente \underline{r} é freqüentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada a reta como modelo matemático, um valor maior que 0,90 é usualmente requerido (INMETRO, 2003). Um coeficiente de correlação maior que 0,99 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (GREEN, 1996).

A ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99. A linearidade da curva analítica e, portanto, o intervalo de trabalho é determinado pelo coeficiente de correlação, também conhecido como *índices de correlação de Pearson* (\underline{r}) da reta obtida e é considerada da seguinte forma (RIEDER et al., 2000):

- $\underline{r} = 1$ – correlação perfeita;
- $0,91 < \underline{r} < 0,99$ – correlação fortíssima;
- $0,61 < \underline{r} < 0,90$ – correlação forte;
- $0,31 < \underline{r} < 0,60$ – correlação média;
- $0,01 < \underline{r} < 0,30$ – correlação fraca.
- $\underline{r} = \text{zero}$ – correlação nula;

Em qualquer técnica instrumental a relação linear é simples e é descrita pela equação $y = a + bx$. A regressão linear só é válida em um determinado intervalo de massa ou concentração da espécie medida. O intervalo de massa ou concentrações, no qual se pode construir uma curva analítica linear, é a faixa linear dinâmica (RIBANI et al., 2004).

A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado. A concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho. Isto requer que os valores medidos próximos ao limite inferior da faixa de trabalho possam ser distinguidos dos brancos dos métodos. Esse limite inferior deve ser igual ou maior que o limite de detecção do método (INMETRO, 2003).

Diferentes recomendações são fornecidas pela literatura e dependem da aplicação. Para fármacos, a ANVISA (2003) recomenda uma faixa entre 80-120% da concentração teórica do analito, a IUPAC recomenda duas faixas: 0-150% ou 50-150% do valor esperado, dependendo de qual destas opções for a mais adequada (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Para análise de resíduos de pesticidas, a Comissão Européia recomenda uma variação de mais ou menos 20% (RIBANI et al., 2004). Para análise de hormônios, não há nenhum valor teórico de concentração que estes analitos possam ser encontrados em efluentes, entretanto, Bila & Dezotti (2003), cita que é necessário técnicas suficientemente sensíveis na determinação destes compostos em ambientes aquáticos, na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} .

A ANVISA (2003) e ICH ("International Conference on Harmonization") recomendam que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo,

cinco níveis de concentração. A IUPAC recomenda seis ou mais níveis de concentração (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

3.7.2. Sensibilidade

A sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito (INMETRO, 2003), e é capaz de distinguir com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas (BRITO et al., 2003). A sensibilidade pode ser expressa pela inclinação da curva analítica, conforme a equação apresentada a seguir e é determinada, simultaneamente, nos testes de linearidade. A sensibilidade depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada (INMETRO, 2003).

$$S = \frac{dy}{dx} \quad (\text{Eq. 01})$$

Onde:

S = sensibilidade;

dx = variação da concentração;

dy = variação da resposta.

Em métodos sensíveis, uma pequena diferença na concentração do analito causa grande variação no valor do sinal analítico medido. Esse critério expressa a capacidade do procedimento analítico gerar variação no valor da propriedade monitorada ou medida, causada por pequeno incremento na concentração ou quantidade do analito. Entretanto, tornou-se errôneo o uso deste termo “sensível” para designar o método com baixo limite de detecção (BRITO et al., 2003; AMARANTE JUNIOR et al., 2001).

3.7.3. Seletividade

A seletividade corresponde à capacidade de um método em determinar o analito de maneira que outras substâncias presentes em uma amostra complexa não interfiram na análise (LANÇAS, 2004b; MARWAH; MARWAH; LARDY, 2005), garantindo que o pico cromatográfico seja exclusivamente do composto de interesse (LANÇAS, 2004b; ANVISA, 2003), demonstrando a capacidade de seleção do analito entre outros compostos que podem estar presentes (ANVISA, 2003), tais como produtos de degradação, impurezas e outras estruturas presentes na matriz (MARWAH; MARWAH; LARDY, 2005). Se a seletividade do método não for assegurada, outros parâmetros do processo de validação, como linearidade, precisão e exatidão, estarão comprometidas (RIBANI et al., 2004).

Segundo Ribani et al. (2004), a seletividade pode ser obtida de várias maneiras, sendo estas duas as mais utilizadas:

- comparação da matriz isenta do analito de interesse, da matriz fortificada com o analito (padrão), nenhum interferente deve eluir no mesmo tempo de retenção que o analito de interesse;
- Avaliação com detectores modernos (arranjo de diodos, espectrômetro de massas), que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão e utiliza-se isso como indicação da presença do composto puro.

O método da adição padrão também pode ser aplicado para os estudos da seletividade (JENKE, 1998).

O termo seletividade é às vezes substituído por especificidade, gerando uma certa confusão que pode ser evitado utilizando somente o termo seletividade (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; CHASIN et al., 1998).

3.7.4. Precisão

A precisão é a expressão da concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra (LANÇAS, 2004b), amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (INMETRO, 2003), está relacionada com a concordância das medidas entre si, ou seja, quanto maior a dispersão dos valores, menor a precisão (BACAN, 2001). A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto (σ), utilizando um número significativo de medições, normalmente superior a 20. Na prática, em validações de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno, e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (s) (RIBANI et al., 2004, POLITO, 2002):

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{Eq. 02})$$

Onde:

\bar{x} = média aritmética de um pequeno número de medidas;

x_i = valor de cada medida;

n = número de medidas;

s = desvio padrão dos valores;

A precisão também pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo, conhecido também como coeficiente de variação (CV):

$$CV(\%) = \frac{s}{M} \times 100 \quad (\text{Eq. 03})$$

Onde:

s = desvio-padrão das recuperações e

M = média das recuperações (RIBANI et al., 2004).

A precisão do método é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetitividade é o resultado do método operando sobre um intervalo de tempo curto, sob as mesmas condições de operação (equipamento, analista, reagentes, mesmo local e mesmas condições ambientais) (LANÇAS, 2004b; BRITO et al., 2003, INMETRO, 2003). Também conhecida como precisão intra-ensaios, pode ser avaliada com no mínimo nove determinações dentro do intervalo de três diferentes concentrações e três replicadas cada, ou no mínimo seis determinações para uma única concentração-teste (BRITO et al., 2003). Envolve várias medidas de uma mesma amostra, em diferentes preparações, e também pode ser denominada precisão intra-ensaio ou intra-corrída, sendo expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RIBANI et al., 2004) também conhecido como coeficiente de variação (LANÇAS, 2004b).

A precisão intermediária expressa o efeito das variações dentro do mesmo laboratório que envolvem diferentes dias, ou diferentes equipamentos, ou diferentes analistas (BRITO et al., 2003) ou uma combinação dos três fatores (RIBANI et al., 2004). Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes (ANVISA, 2003).

Reprodutibilidade, precisão inter-laboratorial é o grau de concordância entre os resultados de ensaios feitos com uma mesma amostra em diferentes laboratórios. São aquelas em que resultados são obtidos usando o mesmo método em diferentes laboratórios, geralmente obtidas em análises colaborativas, manuseado por diferentes operadores e usando diferentes equipamentos (LANÇAS, 2004b), geralmente utiliza-se este procedimento para inclusão de metodologias em farmacopéias (ANVISA, 2003).

3.7.5. Exatidão

Expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor aceito como verdadeiro ou aceito como referência (LANÇAS, 2004b; INMETRO, 2003). A exatidão está relacionada com o seu erro absoluto, isto é, com a proximidade do valor medido em relação ao valor verdadeiro da grandeza, ou seja, está relacionada com a veracidade das medidas (BACAN, 2001). É definida como o valor encontrado pelo método e o valor aceito como verdadeiro ou de referência, sendo calculada pela seguinte equação:

$$Exatidão = \frac{\text{concentração}_{obtida}}{\text{concentração}_{teórica}} \times 100\% \quad (\text{Eq. 04})$$

A exatidão de um método novo pode ser avaliada por quatro tipos de estudos:

- Estudo comparativo com materiais de referência certificados;
- Comparação do método proposto com um método considerado padrão, já bem estabelecido na literatura;
- Estudos de recuperação;
- Estudos colaborativos ou interlaboratoriais (AMARANTE JUNIOR et al., 2001; INMETRO, 2003).

Os materiais de referência, quando disponíveis, são preferencialmente usados, pois estes tem reconhecimento com padrão internacional, porém devido ao seu alto custo, seu uso acaba sendo limitado.

O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado para validação de processos analíticos. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois

reflete a quantidade de determinado analito recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra (BRITO et al., 2003).

A recuperação é uma medida de eficiência do método em isolar o analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias capazes de interferirem na sua determinação (OLIVARES, 2006; CASS; DEGANI, 2001; LANÇAS, 2004b).

O estudo de recuperação consiste na “fortificação” da amostra, ou seja, na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado (BRITO et al., 2003).

É importante considerar como a eficiência do método varia em função da concentração da substância. Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações. Por este motivo, a recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse (RIBANI et al., 2004). A porcentagem de recuperação é calculada pela seguinte fórmula:

$$Rec (\%) = \left(\frac{C_m}{C_p} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 05})$$

Onde:

C_m = Concentração do hormônio na amostra fortificada;

C_p = Concentração do hormônio na solução padrão.

As amostras podem ser adicionadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de quantificação,

próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. A porcentagem de recuperação é determinada por intermédio da comparação de análises em quintuplicatas de três concentrações, de amostras contaminadas com soluções-padrão, as quais representam 100% de recuperação. Embora recuperações próximas a 100% sejam desejadas, admitem-se valores menores, por exemplo, de 50-60%, desde que a recuperação seja precisa e exata (CASS; DEGANI, 2001). Para análise de resíduos, geralmente as porcentagens de recuperação estão entre 70 e 120%, com precisão de $\pm 20\%$.

3.7.6. Limite de detecção (LD)

O limite de detecção corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada como um valor exato (LANÇAS, 2004b; INMETRO, 2003). O LD é definido pelo Comitê de Métodos Analíticos como a menor concentração que pode ser distinguida, com razoável confiança, da região de resposta do branco (AMARANTE JUNIOR et al, 2001), ou ainda, como a menor concentração do analito que produz uma resposta maior do que três vezes o sinal do ruído (CASS; DEGANI, 2001; ANVISA, 2003; MAPA, 2003).

O LD pode ser calculado de três formas: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

No método visual, o LD é determinado utilizando a matriz com adição de concentrações conhecidas do analito de interesse até a visualização da menor concentração visível (detectável) em que seja possível distinguir entre sinal e

ruído. Este procedimento também pode ser feito através do instrumento, utilizando parâmetros de detecção no método de integração (RIBANI et al., 2004).

No método sinal-ruído, o sinal das amostras contendo o analito em concentrações muito baixas é comparado com o sinal de uma amostra branco, que é a matriz isenta do analito de interesse, estabelecendo uma relação sinal-ruído que pode ser 3:1 ou 2:1, proporções geralmente aceitas como estimativa do limite de detecção (RIBANI et al., 2004).

Outra maneira de expressar o limite de detecção é através de parâmetros da curva analítica:

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (\text{Eq. 06})$$

Onde:

s = é a estimativa do desvio padrão da resposta do branco;

S = é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica (SHABIR, 2003).

3.7.7. Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e com uma fidelidade determinada (OLIVARES, 2006; LANÇAS, 2004b). O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob condições experimentais adotadas (CASS; DEGANI, 2001).

O LQ também pode ser estabelecido pelos mesmos métodos utilizados para LD (método visual, método sinal-ruído e método baseado em parâmetros da

curva analítica), sendo que para LQ a relação sinal-ruído adotada é 10:1 (SHABIR, 2003) e a equação utilizada é a seguinte:

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (\text{Eq. 07})$$

Onde:

s = é a estimativa do desvio padrão da resposta do branco;

S = é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica (SHABIR, 2003).

3.7.8. Adição de padrão

Na adição-padrão, quantidades conhecidas de constituinte são adicionadas à amostra desconhecida. Do aumento do sinal, deduz-se quanto do constituinte estava na amostra original. A adição-padrão é especialmente apropriada quando a composição da amostra é desconhecida e afeta o sinal analítico (HARRIS, 2001).

Uma amostra com uma concentração inicial desconhecida de constituinte X_i dá uma área de I_x . Então uma concentração conhecida do padrão, S , é adicionada a uma alíquota da amostra e a intensidade da emissão I_{S+X} é observada para essa segunda solução. A adição do padrão à amostra desconhecida muda a concentração original do constituinte por causa da diluição, dando então uma solução de concentração diluída final X_f . A concentração do padrão na solução final é S_f , levando em consideração que as espécies X e S são as mesmas.

Equação da adição-padrão:

$$\frac{X_i}{S_f + X_f} = \frac{I_x}{I_{S+X}} \quad (\text{Eq. 08})$$

A emissão é diretamente proporcional à concentração do constituinte, então:

$$\frac{A}{B} = \frac{C}{D} \quad (\text{Eq. 09})$$

Onde:

A= concentração de constituinte na solução inicial;

B= concentração de constituinte mais padrão na solução final;

C= sinal da solução inicial;

D= sinal da solução final.

O objetivo da validação é demonstrar que um método analítico é adequado para o seu propósito. Do ponto de vista prático, pode-se dizer que um método, após ser desenvolvido, deve ser submetido a um processo de avaliação para estimar sua eficiência e seu mérito (LEITE, 1996; AMARANTE JUNIOR et al., 2001).

Tradicionalmente, as análises físicas e químicas são as mais usadas na determinação de resíduos e tem como vantagem o desenvolvimento de novos métodos analíticos que podem detectar baixas concentrações de contaminantes em um curto período de tempo. Entretanto, apresenta desvantagens como, por exemplo, os custos elevados dos equipamentos, reagentes e o fato dos efeitos biológicos e sinérgicos das substâncias químicas não serem avaliados.

Para melhor avaliar o impacto causado pelo hormônio 17α -metiltestosterona foram também feitos testes ecotoxicológicos, que segundo Zagatto e Bertoletti (2006), somente através de bioensaios é possível indicar se as águas apresentam condições adequadas ou não à manutenção da vida aquática, pois assim, pode-se detectar possíveis efeitos sinérgicos ou antagônicos. Por isso, foram feitos os testes de toxicidade crônica com os

Cladóceros *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii*, para avaliar se o referido hormônio 17α -metiltestosterona é capaz de ocasionar a reversão sexual nesta classe de invertebrados, já que estes são os primeiros organismos a compor a cadeia trófica. Também foram feitas análises do impacto sobre esses organismos, tais como mortalidade e número de neonatos.

3.8. Ecotoxicologia

O interesse em estudar os danos causados por poluentes nas comunidades aquáticas e nos seus níveis de organização fez com que a Ecotoxicologia Aquática tivesse um grande desenvolvimento nos últimos anos. O termo Ecotoxicologia pode ser definido como a ciência que estuda os efeitos das substâncias químicas e dos agentes físicos sobre os ecossistemas e seus organismos vivos, especialmente nas populações e nas comunidades de um ecossistema definido (FERNICOLA; BOHRER-MOREL; BAINY, 2003). O princípio da ecotoxicologia é a análise dos processos de transferência de contaminantes nos ecossistemas e nos efeitos sobre sua estrutura e funcionamento.

A ecotoxicologia é a ciência responsável pela geração do conhecimento que subsidiará a formulação segura de dispositivos legais, normas, programas e diretrizes gerenciais para enfrentar questões de riscos ecotoxicológicos potencial e real, geradas pela introdução de agentes químicos no ambiente. Os dados gerados são utilizados na avaliação do risco ambiental e regulamentação de novas substâncias químicas, bem como no estabelecimento de critérios de qualidade da água para preservação das comunidades aquáticas e no controle da toxicidade de efluentes em geral.

De acordo com a composição química, algumas substâncias são tóxicas apenas aos peixes, outras somente a microcrustáceos e às vezes a ambos, assim, é aconselhável avaliar os efeitos de agentes tóxicos a mais de uma espécie representativa da biota aquática, para que se possa através dos resultados obtidos com o organismo mais sensível estimar com maior segurança o impacto dessas substâncias em sistema receptor (CETESB, 1990).

Segundo o tempo de exposição, o critério a ser adotado e os organismos testados, caracterizam-se o teste a ser empregado (RAND; PETROCELLI, 1985).

3.8.1. Testes de ecotoxicidade

Desde o início da civilização, o homem tem utilizado e descartado sem tratamento as mais diversas substâncias químicas em ambientes naturais (MASUTTI; ESPÍNDOLA, 2005). Essas substâncias químicas por se tratarem de micropoluentes orgânicos, são substâncias que mesmo estando presentes em pequenas concentrações, são capazes de desencadear efeitos sobre os sistemas em que são introduzidos (REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006).

De acordo com o tempo de exposição dos organismos aos agentes tóxicos, estes testes podem ser classificados em agudos ou crônicos. Os testes de toxicidade são ensaios nos quais um número conhecido de organismos são expostos aos agentes estressantes por períodos conhecidos de tempo e, posteriormente, os efeitos são avaliados quanto à sobrevivência ou mortalidade dos organismos, bem como efeitos comportamentais, morfológicos e fisiológicos (RAND; PETROCELLI, 1985).

- Os testes agudos são os mais usados em laboratório, devida a sua simplicidade e ao curto período de exposição dos organismos aos agentes

tóxicos em um período de 48 h-96 h de exposição (ABNT, 2005). Os testes agudos podem ser estáticos (sem renovação do meio), semi-estáticos ou de renovação, e de fluxo contínuo (com renovação constante do meio com fluxo ininterrupto de soluções tóxicas) (RAND; PETROCELLI, 1985).

- Os testes crônicos fornecem os possíveis efeitos adversos resultantes de uma exposição prolongada, abrangendo parte ou todo o ciclo de vida do organismo, a concentrações subletais de um agente tóxico, que embora permitam a sobrevivência, afetam uma ou várias de suas funções biológicas, interferindo sobre a reprodução, crescimento e maturação, e/ou comportamento em geral (RAND; PETROCELLI, 1985; RAND; WELLS; McCARTHY, 1995).

A atividade da piscicultura tem usado produtos sintéticos, muitas vezes tóxicas em suas atividades, o que em geral, ocasiona problemas aos organismos dos tanques, dos rios e às populações ribeirinhas que utilizam essas águas, bem como pode se tornar um problema ambiental. Desta forma, foram feitos os testes de toxicidade crônica, com os organismos vivos da família Daphnidae, ordem Cladóceras, para avaliar o efeito específico do hormônio 17α -metiltestosterona.

3.8.2. Organismos teste: Cladóceros (*Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii*)

Os invertebrados constituem os organismos-teste mais frequentemente utilizados, sobressaindo-se, entre eles, microcrustáceos conhecidos como cladóceros, que pertencem à classe Branquiópoda, sendo que o tamanho dos indivíduos das espécies varia entre 0,2 e 3,0 milímetros (PENNAK, 1989;

ELMOOR-LOUREIRO, 1997), e peso seco de 50 a 400 µg. Os cladóceros, também conhecidos como pulgas d'água, são um pouco mais evoluídos que os demais da mesma classe (PENNAK, 1989).

- *Daphnia similis*, (Crustácea, Cladocera), descrita em 1820 por Straus, é um microcrustáceo planctônico com comprimento máximo de 3,5 mm, que atua como consumidor primário na cadeia alimentar aquática e se alimenta por filtração de material orgânico particulado em suspensão. Os organismos desse gênero tem larga distribuição no hemisfério norte (ABNT, 2004).
- *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustácea, Cladocera), descrita por Daday em 1902, é um microcrustáceo zooplanctônico de 0,8 a 0,9 mm de comprimento, de corpo ovalado com acentuado sinus cervical e com 9 a 12 espinhos anais, que atua como consumidor primário na cadeia alimentar aquática e se alimenta por filtração de material orgânico particulado. Esses organismos são encontrados no Brasil e na Argentina (ABNT, 2005).

A escolha das espécies de cladóceros *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii* como organismo-teste se deve a vários motivos, que além de apresentar os requisitos básicos necessários para os ensaios, a *Daphnia similis* é maior que a *Ceriodaphnia silvestrii*, e apresenta facilidade na montagem e manutenção do teste, entretanto, a *Ceriodaphnia silvestrii* visa o desenvolvimento de teste de toxicidade de menor duração, já que tem um ciclo de vida mais curto e maior sensibilidade. Também tem o fato de que estas espécies apresentam representatividade em corpos d'água interiores, sendo o gênero *Ceriodaphnia*

mais representativo quando comparada à *Daphnia*, sendo possível a coexistência de diversas espécies.

Têm importância ecológica na cadeia trófica de ambientes aquáticos, pois ocupam uma posição estratégica nas comunidades aquáticas, comportando-se como importantes herbívoros, alimentam-se de algas, bactérias e materiais em suspensão, e constituem uma fração significativa da dieta de numerosas espécies de peixes e outros predadores, representando portanto, um importante elo nas cadeias alimentares aquáticas; estabilidade genética, o predomínio da reprodução assexuada do tipo partenogenética, que permite a maximização da taxa de crescimento populacional, pois todos os descendentes são fêmeas, tendo portanto, a preservação das combinações genéticas, obtendo-se populações homogêneas e com sensibilidade constante (RAND; WELLS; McCARTHY, 1995).

Tem também a facilidade de cultivo e manutenção de culturas, pois apresentam ciclos de vida relativamente curtos e pequena dimensão corpórea, requerendo pequenos volumes de água, o que facilita seu cultivo e manutenção em laboratório, além do conhecimento de biologia da espécie e sua sensibilidade a uma grande variedade de contaminantes ambientais.

Os cladóceros vivem em riachos, lagos e lagoas. Nadam por meio de suas segundas antenas muito potentes, o movimento é, em grande parte, vertical e quase sempre muito rápido e aos saltos. O golpe, para baixo, das antenas impulsiona o animal para cima, depois ele submerge lentamente, usando as antenas como se fossem pára-quedas (BARNES, 1984), utilizam as patas para a captura de alimentos (PENNAK, 1989).

Os cladóceros são filtradores e são abundantes em água doce, apresentam alta produtividade secundária, e representam juntamente com outros

grupos que compõem o zooplâncton, o elo intermediário da cadeia alimentar, através do qual a energia flui para os níveis tróficos superiores chegando até os peixes, aves aquáticas e ao ser humano (ROCHA & GÜNTZEL, 2006).

Um dos cladóceros, a *Ceriodaphnia silvestrii*, utilizada neste trabalho, possui forma arredondada, olho grande ocupando quase toda a região anterior da cabeça, possui fórnices projetados lateralmente. O macho é bem semelhante à fêmea, porém apresenta menor tamanho (ELMOOR-LOREIRO, 1997). Essas características podem ser observadas na Figura 06.

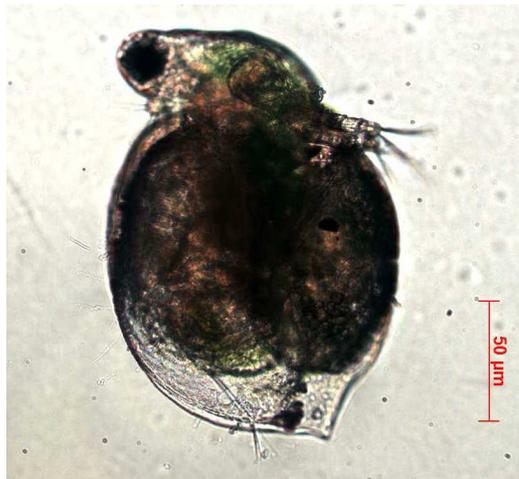


Figura 06: *Ceriodaphnia silvestrii* (fêmea adulta)- Imagem capturada das culturas do laboratório de Ecotoxicologia do CRHEA-USP-São Carlos.

Em relação a *Daphnia similis*, esta possui cabeça grande, arredondada e forma semilunar a relativamente quadrada, as antenas são curtas, e paralelas à margem anterior da cabeça, conforme Korinek e Frey (1991). Essas características podem ser observadas na Figura 07.



Figura 07: *Daphnia similis* (fêmea adulta)- Imagem capturada das culturas do laboratório de Ecotoxicologia do CRHEA-USP-São Carlos.

No Estado de São Paulo, as espécies *Ceriodaphnia silvestrii* e *Daphnia similis* foram amplamente estudada e testada em estudos ecotoxicológicos, para substituir aquelas de regiões temperadas, visto serem igualmente ou até mais sensíveis.

Para a análise estatística foi utilizado o teste de Tukey para analisar os dados de reprodução, nas concentrações em que a sobrevivência dos organismos-teste não foi significativamente diferente do controle. A normalidade dos dados de reprodução foi analisada pelo método do CHI-quadrado. O programa computacional TOXSTAT 3.3 foi utilizado para a aplicação dos testes (GULLEY; BOELTER; BERGMAN, 1991).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Desenvolver e validar os métodos para a determinação do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras de água e de sedimentos de piscicultura e empregar os testes de ecotoxicidade para avaliar o impacto ambiental causado por este hormônio.

4.2. Objetivos específicos

- Desenvolver e validar métodos de extração do 17 α -metiltestosterona para amostras de água e sedimentos de piscicultura;
- Aplicar o método de extração em fase sólida otimizado para a extração do hormônio 17 α -metiltestosterona das amostras de água de piscicultura;
- Otimizar o método de extração do hormônio de sedimentos de piscicultura;

-
- Utilizar a cromatografia líquida de alta eficiência para determinar o hormônio presente nas amostras de água e de sedimentos de piscicultura;
 - Verificar a degradação do hormônio 17 α -metiltestosterona em laboratório;
 - Empregar os microcrustáceos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii* para verificar a toxicidade crônica do hormônio;
 - Empregar os microcrustáceos *Ceriodaphnia silvestrii* para verificar a reversão sexual nos organismos com o hormônio 17 α -metiltestosterona.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Seleção do hormônio para estudo

O hormônio 17α -metiltestosterona foi selecionado por ser o mais utilizado em pisciculturas do cultivo de tilápias e outras culturas de peixes que se deseja reverter sexualmente peixes geneticamente fêmeas para machos fenotipicamente. Esse hormônio é de fácil aquisição, aplicação e apresenta boa taxa de reversão.

5.2. Local de estudo

As amostras utilizadas neste estudo foram coletadas em uma piscicultura no município de Socorro-SP. Os efluentes dessa piscicultura são lançados no Ribeirão dos Machados→Rio do Peixe→Rio Mogi-Guaçu.

O município de Socorro foi fundado em 09/08/1829, tem latitude de $22^{\circ} 35' 29''$ S e longitude de $46^{\circ} 31' 44''$ W (EXPLOREVALE, 2003) com 32.704 habitantes e 448,074 km² de área territorial (IBGE, 2004), sendo 430,3 Km² de área rural, onde residem 35% de seus moradores, justificativa para o grande número de pisciculturas e pesque-pagues. Socorro nasceu às margens do Rio do Peixe, o principal rio que corta a cidade, que é um dos afluentes do Rio Mogi-Guaçu. O município está nos limites da Serra da Mantiqueira, a poucos quilômetros da divisa de São Paulo com Minas Gerais (EXPLOREVALE, 2003).

(BRIGANTE; ESPÍNDOLA; ELER, 2006). Seus principais afluentes pela margem direita são os rios Oricanga, Itupeva, Cloro e Jaguari Mirim; e pela esquerda, Eleutério, do Peixe, do Roque, Quilombo e Mogi Mirim. (SIGRH, 2001). O rio do Peixe tem 1143,1 km² de área de drenagem (BRIGANTE; ESPÍNDOLA; ELER, 2006).

As Figuras 09 (A) e (B) e Figura 10 apresentam o local das coletas feitas no município de Socorro.



(A)



(B)

Figura 09: Vista dos tanques de coleta da piscicultura no município de Socorro-SP.



Figura 10: Vista do tanque 15 na piscicultura no município de Socorro-SP.
Fotos: Luigi Mazzucco

5.3. Amostragem

As coletas das amostras foram feitas nas seguintes épocas do ano: a primeira coleta em janeiro de 2006, a segunda em abril de 2006. As amostras testemunho (amostras utilizadas para os testes de recuperação) foram coletadas no Rio Santa Maria do Leme, situado na Rua Eliza Gonzalez Rabelo, cidade de São Carlos, estado de São Paulo, local onde não existia atividade de piscicultura.

5.3.1. Coleta das amostras de água

As amostras de água foram coletadas e armazenadas em frascos de vidro âmbar, hermeticamente fechados, mantidos em isopor com gelo e transportadas ao laboratório, onde foram armazenados em geladeira a 4 °C. Na coleta optou-se pela utilização de amostras simples, onde se coletou em um ponto na entrada da água no tanque, outro no centro, e outro na saída, ao invés de amostragens compostas, obtidas pela mistura de amostras de diferentes pontos.

Um multissensor de análise da qualidade da água, denominado Water Quality Checker (WQC), da marca Horiba, modelo U-10 foi utilizado para obter as medidas de condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, pH e temperatura, em tempo real.

As amostras de água foram coletadas em três locais diferentes, como é apresentado na Tabela 01.

Tabela 01: Tanques onde foram coletados as amostras de água na piscicultura e as localidades dos pontos de coleta dentro dos tanques.

	Pontos coletados	Data da coleta
Água para estudo de recuperação	Em São Carlos	Setembro de 2004
Nascente	Somente um	19/01/2006 26/04/2006
Tanque 4	Entrada	19/01/2006
	Centro	19/01/2006
	Saída	19/01/2006
Tanque 5	Entrada	19/01/2006
	Centro	19/01/2006
	Saída	19/01/2006
Tanque 6	Entrada	26/04/2006
	Centro	26/04/2006
	Saída	26/04/2006
Tanque 9	Entrada	26/04/2006
	Centro	26/04/2006
	Saída	26/04/2006
Tanque 15	Entrada	19/01/2006 26/04/2006
	Centro	19/01/2006 26/04/2006
	Saída	19/01/2006 26/04/2006

5.3.2. Coleta das amostras dos sedimentos

As amostras dos sedimentos foram coletadas próximo ao local de entrada da água no tanque e outro próximo ao ponto de saída do efluente. As amostras de sedimentos foram coletadas a uma profundidade de 10 a 15 cm, por intermédio de testemunhador, feito de plástico PVC, e adaptado com uma rolha na extremidade superior. O testemunhador foi então emergido na água, penetrado nos sedimentos e tampado na seqüência com uma rolha e só então foi retirado da água. A rolha serve para manter a pressão dentro do testemunhador e evitar que os sedimentos sejam desprendidos do seu interior.

As amostras dos sedimentos foram armazenadas em potes plásticos de 500 gramas, colocadas em caixas de isopor com gelo e conduzidas ao laboratório, onde foram armazenadas em freezer, secas à temperatura ambiente, desagregadas em almofariz e peneiradas.

As amostras dos sedimentos foram coletados em dois locais diferentes e a Tabela 02 apresenta os pontos de coletas.

Tabela 02: Tanques onde foram coletados os sedimentos da piscicultura e a localidade dos pontos de coleta dentro dos tanques.

	Pontos coletados	Data da coleta
Sedimentos para estudo de recuperação	Em São Carlos	Janeiro de 2005
Nascente	Somente um	26/04/2006
Tanque 4	Entrada	19/01/2006
	Saída	19/01/2006
Tanque 5	Entrada	19/01/2006
	Saída	19/01/2006
Tanque 6	Entrada	26/04/2006
	Saída	26/04/2006
Tanque 9	Entrada	26/04/2006
	Saída	26/04/2006
Tanque 15	Entrada	19/01/2006 26/04/2006
	Saída	19/01/2006 26/04/2006

5.4. Reagentes e solventes utilizados

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico: Metanol (J. T. Baker, 100%), Etanol (J. T. Baker, 99,98%), Acetonitrila (J. T. Baker, 99,8%), Acetato de Etila (Mallinckrodt UltimAR[®], 99,6%), Acetona (Synth, 99,5%), Ácido sulfúrico (Quemis, 95-98%), Ácido nítrico (Synth, 64-66%) e Água ultrapura (Milli-Q, Millipore). O padrão de referência do hormônio sintético

17 α -metiltestosterona foi obtido da Spectrum Chemical MFG.Corp, com pureza mínima de 97%.

5.5. Determinação da porcentagem de matéria orgânica dos sedimentos via calcinação (pesagem)

Para determinar os teores de matéria orgânica foram pesados 5,0 g dos sedimentos e transferidos em cada cadinho (em triplicata). Posteriormente, as amostras dos sedimentos foram levadas ao forno mufla, marca EDG, modelo 1800-3P, a 600°C por 2 horas, decorridos o tempo de calcinação, os cadinhos foram resfriados em dessecador e depois feita a pesagem. Fez-se uma média aritmética dos resultados obtidos em três determinações. A porcentagem de matéria orgânica foi obtida por meio da diferença entre o peso inicial da amostra e o peso após a calcinação.

5.6. Granulometria

A determinação granulométrica das amostras dos sedimentos foi baseada na metodologia descrita pela ABNT (1968)- Análise Granulométrica de Solos (Método Brasileiro), sendo utilizado o método combinado de análise por sedimentação (densímetro) e por peneiramento, obtendo-se as frações de areia, silte e argila em porcentagem.

5.7. Solução padrão de 17 α -metiltestosterona e curva analítica

A solução estoque do hormônio 17 α -metiltestosterona foi preparada separadamente na concentração de 100 mg L⁻¹ do hormônio em etanol, foram colocadas em frascos de vidro âmbar e estocadas em geladeira a 4 °C. A partir

desta, as soluções padrão necessárias para as análises foram obtidas através de diferentes diluições para se obter o limite de detecção e compor a curva analítica. As concentrações utilizadas foram 10,0 - 50,0 - 100,0 - 200,0 - 400,0 e 600,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

5.8. Condições cromatográficas para determinação do hormônio nas amostras de água e de sedimentos de piscicultura

As determinações analíticas do hormônio 17α -metiltestosterona foram feitas empregando-se um cromatógrafo SHIMADZU com bombas LC-10AD com detector (SPD UV-VIS). Foi utilizada uma coluna de fase reversa de aço inoxidável (C_{18}), de 15 cm de comprimento, diâmetro interno de 4,6 mm e o tamanho da partícula de 5 μm . As condições cromatográficas ideais para a análise do hormônio, onde foram determinadas e estão apresentadas na seção *resultados e discussão*.

5.9. Limpeza da vidraria

A vidraria utilizada foi imersa em Extran 20% (MA-02-neutro, Merck) e após 1 hora foi enxaguada em água corrente e imersa em sulfonítrica ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$) 1:1 por aproximadamente 30 minutos, sendo novamente enxaguada em água corrente, depois em água ultrapura, e em seguida em etanol. A secagem da vidraria foi feita em estufa à temperatura de aproximadamente 60 °C, sendo posteriormente envolvida em papel alumínio e colocada em armário. O material volumétrico foi seco à temperatura ambiente.

5.10. Procedimento para a extração do hormônio das amostras de água e de sedimentos

Para a extração do hormônio foi utilizado metodologias diferentes para as amostras de água e de sedimentos.

5.10.1. Amostras de água

5.10.1.1. Determinação do nitrogênio amoniacal (amônia) nas amostras de água da piscicultura

Para a determinação do nitrogênio amoniacal foi feito o seguinte procedimento, utilizando um teste importado COHESP, fornecido pelo CDCC-USP-São Carlos:

- a) preencheu a cubeta plástica com a amostra até a marca vermelha (3,0 mL);
- b) adicionou 2 gotas do reagente líquido (K-1 para NH_4);
- c) com o auxílio da lâmina cortante, abriu uma das ampolas plásticas pequenas e adicionou o seu conteúdo à cubeta com a amostra. Tampou e agitou por alguns segundos;
- d) com o auxílio do alfinete de cabeça amarela, perfurou uma das ampolas plásticas grandes em uma de suas extremidades, atingindo-a de lado a lado;
- e) segurou firmemente a ampola plástica grande entre o polegar e o indicador e pressionou-a de modo a expulsar parte do ar que existia em seu interior. Mantendo-a pressionada, inseriu sua extremidade perfurada na cubeta com a amostra preparada e aliviou a pressão, de modo a

succionar parte da amostra para dentro da ampola, com num efeito de um conta gotas. Notou-se que a quantidade da amostra succionada preencheu a ampola até sua metade aproximadamente;

- f) agitou a ampola e aguardou 10 minutos. Se houvesse amônia na amostra, a ampola adquiriria certa coloração que deveria ser comparada com a tabela de cores padronizada no verso da tampa do kit. Caso a coloração adquirida pela ampola não encontrasse semelhança com a cor padronizada correspondente ao máximo da escala, diluía novamente a amostra e repetia a análise (SCHIEL, SANTOS, RUFFINO, 2000).

5.10.1.2. Determinação de coliformes fecais nas amostras de água da piscicultura

Para a realização do teste de coliformes fecais foi utilizado o “Kit Acquatest” COHESP fornecido pelo CDCC-USP-São Carlos:

- a) retirou a fita de teste do saco plástico, tocando-a apenas pela parte de cima do picote;
- b) umedeceu a fita de teste na amostra até o picote, deixando escorrer o excesso da amostra;
- c) retornou a fita de teste à sua embalagem plástica, destacando a parte picotada que entrou em contato com os dedos;
- g) deixou a fita secar à temperatura de aproximadamente 36 °C e analisou quanto à presença de coliformes fecais (SCHIEL, SANTOS, RUFFINO, 2000).

5.10.1.3. Extração das amostras de água sem o hormônio (branco)

Uma amostra de 300 mL de água coletada na nascente da piscicultura de Socorro que não continha o hormônio foi filtrada à vácuo e extraída como no procedimento descrito na Figura 11:

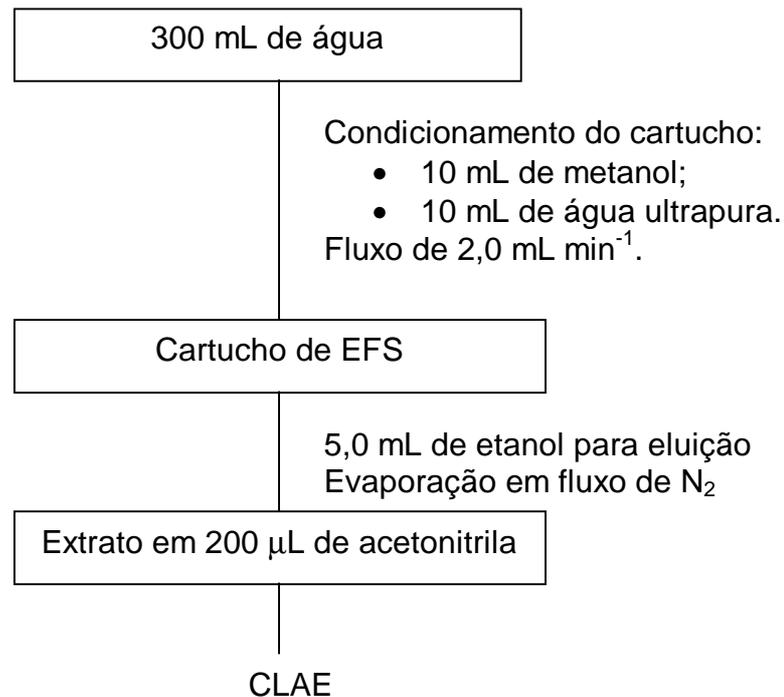


Figura 11: Fluxograma de extração do hormônio das amostras de água da piscicultura.

5.10.1.4. Extração das amostras fortificadas para estudo do melhor solvente para eluição do analito de interesse

As amostras fortificadas coletadas no rio Santa Maria do Leme foram homogêneas e deixadas em repouso à temperatura ambiente. Foram filtradas a vácuo e fez-se o procedimento de extração, como descrito na seção 5.10.1.3. A extração foi feita em triplicata.

Cada amostra foi eluída com um solvente diferente. A amostra **A** foi eluída com 5 mL de acetato de etila, a amostra **B** foi eluída com 5 mL de etanol e a amostra **C** foi eluída com 5 mL de acetona. As amostras foram evaporadas

separadamente até a secura com nitrogênio gasoso e posteriormente ressuspendidas em acetonitrila.

Após determinada a melhor condição para a análise do hormônio, esse procedimento foi aplicado nos estudos de recuperação do analito em água fortificada com o hormônio 17 α -metiltestosterona, sendo portanto, feitas em três diferentes concentrações (60,0; 80,0 e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) e cada concentração em quintuplicata.

5.10.1.5. Extração do hormônio das amostras de água coletadas na piscicultura de Socorro

As amostras de água coletadas na piscicultura de Socorro foram homogeneizadas e deixadas em repouso à temperatura ambiente e em seguida, fez-se filtração à vácuo, a extração foi feita como descrito no item 5.10.1.3.

Como as concentrações do hormônio nas amostras ficaram abaixo do limite de detecção, foi utilizado o procedimento de adição de padrão na amostra, 200 μL de extrato final da amostra foi injetado em triplicata de 20 μL cada, depois adicionou-se aos 140 μL restantes do extrato final uma quantidade conhecida de 14 μL do padrão de 10 mg L^{-1} . A área inicial e a área final foram aplicadas nas equações 08 e 09, descritas nas páginas 42 e 43, onde se obteve por diferença a concentração do hormônio na matriz.

A extração do hormônio das amostras de água foi feita em triplicata.

5.10.2. Amostras de sedimentos

5.10.2.1. Extração das amostras de sedimentos sem o hormônio (branco)

As amostras de sedimentos foram coletadas no rio Santa Maria do Leme. Pesou-se três frações dos sedimentos secos do estudo de recuperação em uma balança (AG 200), misturou-se 20,0 mL de etanol para a amostra **A**, 20,0 mL de acetona para a amostra **B** e 20,0 mL de acetato de etila para a amostra **C**. As amostras foram levadas ao ultra-som (ULTRAsonic 1440 Plus Marca ODONTOBRAS) e depois centrifugadas (EXCELSA BABY II, modelo 206-R, marca FANEM[®]) (Adaptado de BABIC; PETROVIC; KASTELLAN-MACAN, 1998).

As amostras foram colocadas no rotaevaporador (FISATOM 802), separadamente. Em seguida, ressuspendeu-se as amostras e transferiu-as para frascos de vidro âmbar. As amostras foram secas suavemente em gás nitrogênio, e então ressuspendidas em etanol, finalmente analisadas por CLAE, conforme é apresentado na Figura 12:

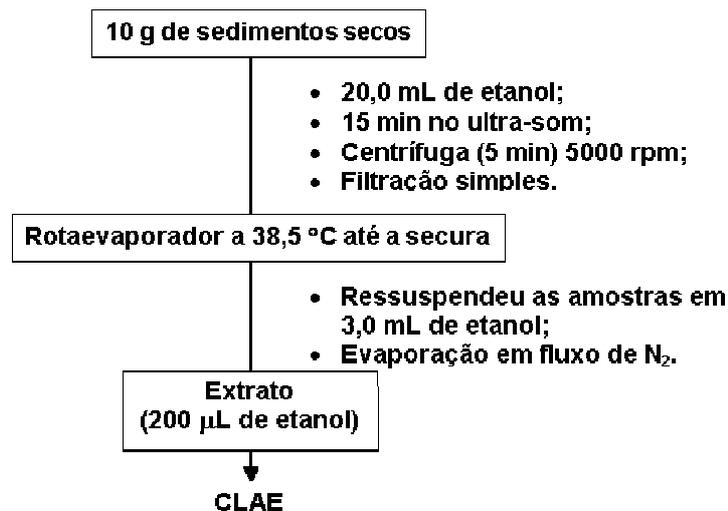


Figura 12: Fluxograma de extração do hormônio das amostras de sedimentos.

5.10.2.2. Extração das amostras fortificadas

O procedimento experimental constou da adição de volumes das soluções padrão na matriz dos sedimentos a fim de que as concentrações finais dos analitos, após a etapa de extração, fosse como descrito a seguir.

Para obter a concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ nos sedimentos em $1,0 \text{ mL}$ de solução final, adicionou-se $200 \text{ }\mu\text{L}$ do padrão de uma solução de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$.

$$C = \frac{m}{V} \rightarrow \frac{5 \text{ mg}}{L} = \frac{m}{200 \cdot 10^{-6} L} \rightarrow m = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mg}$$

$$C = \frac{m}{V} \rightarrow \frac{1 \text{ mg}}{L} = \frac{1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mg}}{V} \rightarrow V = 1,0 \cdot 10^{-3} L \rightarrow V = 1 \text{ mL}$$

A extração do hormônio das amostras dos sedimentos foi feita em triplicata para cada solvente. Depois de verificar o melhor solvente, o procedimento foi aplicado para o estudo de recuperação, onde foram preparadas três soluções com concentrações diferentes ($300,0$; $400,0$ e $500,0 \text{ }\mu\text{g Kg}^{-1}$) e cada concentração em quintuplicata. O sedimento foi coletado no rio Santa Maria do Leme.

5.10.2.3. Extração do hormônio das amostras dos sedimentos coletadas na piscicultura de Socorro

Para a extração do hormônio das amostras dos sedimentos coletadas na piscicultura, foram feitas os mesmos procedimentos descritos no item 5.10.2.1.

A extração das amostras dos sedimentos foi feita em triplicata. Também foi feito o procedimento de adição-padrão, onde os $200 \text{ }\mu\text{L}$ de extrato final foi injetado em triplicata de $20 \text{ }\mu\text{L}$ cada, restando $140 \text{ }\mu\text{L}$ e nesse volume foi

adicionado 14 μL do padrão de 10 mg L^{-1} . A área inicial e a área final foram aplicadas nas equações 08 e 09 descritas nas páginas 42 e 43 onde se obteve por diferença a concentração do hormônio na matriz.

5.11. Degradação do hormônio em laboratório

Foi preparada uma solução de 15 mL de água/etanol (90:10 v/v) na concentração de 10 mg L^{-1} do hormônio 17 α -metiltestosterona. A solução foi transferida para um frasco transparente, e em seguida, o mesmo foi lacrado e exposto por seis meses à luz solar, depois de decorrido este tempo, o mesmo foi analisado por CLAE e comparado com uma mesma solução de mesma concentração preparada no momento da análise.

5.12. Testes de ecotoxicidade do hormônio 17 α -metiltestosterona

A avaliação rotineira da sensibilidade com substâncias de referência permite determinar o estado fisiológico dos organismos, isto é, a saúde dos organismos.

Daphnia similis e *Ceriodaphnia silvestrii* (Cladocera, Crustácea), cujos exemplares foram obtidos em culturas mantidas no Laboratório de Ecotoxicologia do Núcleo de Estudos em Ecossistemas Aquáticos (NEEA) do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CRHEA/EESC/USP), onde já são cultivadas rotineiramente a maior parte das espécies testadas.

5.12.1. Cultivo e manutenção dos organismos-teste

Organismos jovens de *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii* com idade de aproximadamente 3 h a 18 h, obtidos por partenogênese, a partir de fêmea

com idade entre 7 e 21 dias, foram cultivados nas condições descritas na norma da ABNT (2005).

A manutenção do cultivo de organismos em laboratório inclui o preparo da água de cultivo, bem como o acompanhamento de parâmetros como pH, dureza, condutividade e preparo do alimento utilizado.

A água de cultivo (ANEXO I) foi preparada com água natural coletada em poço artesiano na Fazenda Santa Cândida de propriedade da Empresa de Desenvolvimento Urbano SOBLOCO SA, no município de São Carlos. Ajustou-se a dureza para a faixa requerida de 40 a 48 mg L⁻¹ de CaCO₃, pH para a faixa de 7,2-7,6 e condutividade de 160 µS cm⁻¹. O ajuste da dureza foi feito utilizando as soluções 1 e 2 (ANEXO II), considerando que para cada miligrama de dureza da água a ser aumentada, acrescentou-se 0,5 mL da solução 1 e 0,25 mL da solução 2 por um litro de água. A medida da dureza da água foi feita por titulação com solução de EDTA e indicador negro de ericromo T (ANEXO III). A água foi aerada para solubilização total dos sais, saturação do oxigênio dissolvido e estabilização do pH durante durante 12 h, antes da utilização (ASTM, 1994).

Como alimento para os dafinídeos foram utilizadas cultura de *Selenastrum capricornutum* em fase exponencial de crescimento e alimento composto por levedura e ração de peixe (ABNT, 2005). Para ser utilizada como alimento, a suspensão algácea *Selenastrum capricornutum* foi primeiramente mantida em geladeira para decantação, depois o sobrenadante foi desprezado e o decantado foi ressuspendido em água de manutenção das culturas. O número de células da suspensão foi determinado através de contagem empregando-se para isso um microscópio óptico da marca ZEISS, utilizando-se câmaras de contagem. Cada organismo recebeu 10⁵ células por um litro de solução-teste, a cada dois

dias para a cultura de *Daphnia similis*, e 60% desse valor para a cultura de *Ceriodaphnia silvestrii*.

O alimento composto foi preparado misturando-se partes iguais de ração para peixe e levedura. Após o preparo, conservou-se em geladeira por um período máximo de uma semana. Este alimento juntamente com a suspensão de algas fornece uma alimentação adequada aos microcrustáceos.

Os organismos foram mantidos em cristalizadores com capacidade de 2 L com 50 e 70 organismos por cristizador de *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii*, respectivamente, em câmara incubadora com controle de luz e temperatura (fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, intensidade luminosa de aproximadamente 1000 lux, e temperatura entre 23 ± 1 °C. Os frascos foram cobertos com tampa transparente.

5.12.2. Testes de reprodução para *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii* e teste de reversão sexual da *Ceriodaphnia silvestrii*

Para os testes de toxicidade crônica com neonatos de *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii* foram seguidas as recomendações da ABNT (2005).

As espécies foram mantidas em culturas individuais, onde cada organismo foi colocado em copo transparente acrílico da marca COPAZA® de 50 mL de volume, contendo 15 mL de meio, para a cultura de *Ceriodaphnia silvestrii* e copos de 100 mL de volume com 40 mL de meio para a cultura de *Daphnia similis*. Ambas as espécies foram mantidas em duas concentrações das soluções-teste (1,0 e 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), esses valores escolhidos para a montagem das soluções-teste foram baseados em um trabalho descrito por Green e Teichert-

Coddington (2000), que desenvolveu um estudo sobre o descarte das águas de pisciculturas nos Estados Unidos e encontrou em seus efluentes esses valores.

Foi montado um controle com água de cultivo e outro com água de cultivo mais etanol, que foi o solvente utilizado para solubilizar o hormônio 17α -metiltestosterona, as soluções-teste foram renovadas três vezes por semana, normalmente as segundas, quartas e sextas-feiras, verificando-se as medidas das seguintes variáveis: pH, com Potenciômetro marca MICRONAL, modelo B-174; condutividade iônica, com condutivímetro, modelo ORION-145, com célula de condutividade, modelo ORION-011510; concentração de oxigênio dissolvido, com oxímetro modelo Minipa, MDO-5509, e dureza. Todas as medidas foram feitas a cada renovação do meio, e também no momento do descarte das soluções-teste.

Foi também realizado um teste com etanol sem o hormônio para a cultura de *Ceriodaphnia silvestrii*, nas mesmas condições utilizadas para o cultivo com hormônio, entretanto, devido ao fato das culturas não estarem boas, foi feito teste com três diferentes concentrações de etanol (25, 50 e 125 μ L do solvente por litro de água de cultivo), para verificar se os problemas de reprodução e mortalidade estavam relacionados ao solvente utilizado para solubilizar o hormônio 17α -metiltestosterona.

Para cada concentração foram testadas 10 réplicas, com um organismo cada. As soluções-teste foram preparadas em balões volumétricos e foram transferidas para os recipientes-teste com o auxílio de um proveta.

Durante o período do teste, os organismos foram mantidos cobertos com plástico transparente em sala iluminada com fotoperíodo de 12 horas de escuro e 12 horas de iluminação e em sala com temperatura de 23 ± 1 °C.

Os neonatos de *Daphnia similis* foram colocados em contato com as diferentes concentrações do hormônio, até a obtenção da terceira cria, onde todas as crias foram contadas. Foi efetuada a contagem de organismos imóveis e o número de organismos que não tiveram cria.

O mesmo procedimento foi feito para a cultura de *Ceriodaphnia silvestrii*. Entretanto, os neonatos da primeira, terceira e quarta crias foram cultivados em água de cultivo, até obterem a primeira cria, sendo descartados em seguida. Os organismos que não tiveram cria foram colocados em formol a 10%, onde posteriormente foram analisados para se fazer a determinação do sexo da *Ceriodaphnia silvestrii* em um microscópio estereoscópico marca ZEISS.

Nos estudos com as duas culturas foram consideradas a sobrevivência e a reprodução, ou seja, o número médio de neonatos por fêmea, a taxa de mortalidade, e também a taxa de reversão sexual nos neonatos de *Ceriodaphnia silvestrii* quando utilizado a cultura com diferentes concentrações do hormônio. Para a cultura de *Ceriodaphnia silvestrii* em diferentes concentrações de etanol, foi verificado a sobrevivência e a reprodução, sendo criados até obtiverem a primeira cria.

Os testes de ecotoxicidade não foram feitos em conjunto. Primeiramente com *Daphnia similis*, onde foi escolhida devido ao seu tamanho e por apresentar melhor visualização. Esta espécie foi testada por vários experimentos e a partir de então, optou-se pelo uso da *Ceriodaphnia silvestrii*, onde se viu a viabilidade do uso desta cultura, pelo seu curto ciclo de vida, e também apresentava resultados similares à *Daphnia similis*.

Foram montados vários experimentos para se obter uma boa repetibilidade entretanto, devido a problemas relacionados à cultura, foi

necessário o uso neste trabalho dos experimentos considerados válidos em função da sobrevivência mínima no controle (60%) e entre renovações consecutivas de água (80%) (ABNT, 2005).

Ao final dos testes foram avaliadas as seguintes variáveis: fecundidade e sobrevivência. Os testes foram considerados válidos seguindo os seguintes critérios em relação ao controle: sobrevivência maior que 80% e fecundidade média maior ou igual a 15 neonatos por fêmea.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Considerações gerais

Dados analíticos envolvendo resultados de amostras ambientais são de fundamental importância e são úteis para vários propósitos. Estes dados são gerados para investigar como atividades humanas influenciam o ambiente. Para desenvolver, calibrar e validar modelos ambientais, para testar se padrões ou critérios de qualidade são excedidos e para deduzir se há um risco potencial para o ecossistema.

Uma comissão da International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) que representa a divisão de química e meio ambiente, formulou um guia para relatos de dados analíticos de amostras ambientais. As recomendações sugeridas neste guia referem-se às informações mínimas que devem ser apresentadas para descrever adequadamente a estratégia e métodos de amostragem, incluindo o método de validação e cálculos estatísticos. Uma atenção especial é dada às seguintes amostras ambientais: solo, águas superficiais e subterrâneas, sedimentos, água de chuva e oceânicas e ar (EGLI et al., 2003).

Os procedimentos adotados e os resultados apresentados neste estudo seguem as recomendações dos trabalhos de revisão sobre validação de métodos

analíticos (AMARANTE JUNIOR et al., 2001; ANVISA, 2003; CASS; DEGANI, 2001; INMETRO, 2003; LANÇAS, 2004b; LEITE, 1996; MAPA, 2003; MARWAH; MARWAH; LARDY, 2005; OLIVARES, 2006; POLITO, 2002; RIBANI et al., 2004; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

6.2. Otimização das condições cromatográficas para a análise do 17 α -metiltestosterona

Considerando a polaridade do hormônio estudado, selecionou-se como fase estacionária uma coluna (C₁₈) de fase reversa, onde a fase móvel é mais polar que a fase estacionária. A fase móvel pode ser uma mistura de acetonitrila-água, e pode ter a acetonitrila substituída, quando necessário, por metanol. Estas são as fases mais usadas (HARRIS, 2001).

De acordo com Shabir (2003), a etapa inicial da análise de validação de uma metodologia consiste em processos simples, como avaliar a razão do fluxo da fase móvel e o comprimento de onda selecionado, dentre outros. Baseado neste trabalho, foram otimizados os parâmetros experimentais tais como: escolha da coluna, composição e fluxo da fase móvel.

6.3. Seleção do comprimento de onda utilizado em CLAE-UV

Obteve-se os espectros de absorção do hormônio 17 α -metiltestosterona, que compreenderam uma varredura de 200 a 800 nm. O comprimento de onda correspondente ao máximo de absorbância do analito foi selecionado para a determinação analítica empregando-se um cromatógrafo em fase líquida com detector de UV-Vis.

A Figura 13 apresenta, o espectro UV-Vis do 17α -metiltestosterona. O comprimento de onda selecionado (λ_{\max}) foi de 245 nm para o composto estudado.

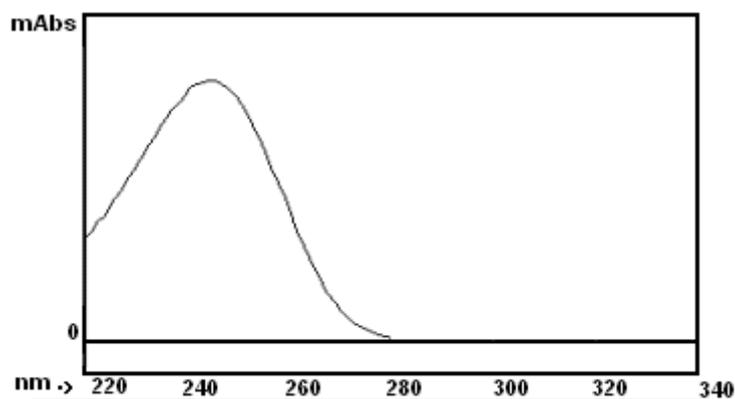


Figura 13: Espectro de UV-Vis do hormônio 17α -metiltestosterona.

Stolker et al. (1999) empregaram em seu estudo sobre fortificação de urina bovina com 17α -metiltestosterona o mesmo comprimento de onda selecionado neste estudo.

Gonzalo-Lumbreras e Izquierdo-Hornillos (2003) também utilizaram o comprimento de 245 nm no seu estudo sobre validação do método para determinação do hormônio em material recoberto com o hormônio 17α -metiltestosterona.

6.4. Condições cromatográficas para a determinação do hormônio 17α -metiltestosterona

Para se obter a melhor separação cromatográfica foram testadas duas colunas, as quais tem o comprimento, e o tamanho das partículas da fase estacionária diferentes:

- coluna RP-18, 200 mm X 4,6 mm, 10 μ m, da Hewlett Packard;
- coluna RP-18, 150 mm X 4,6 mm, 5 μ m, da Hewlett Packard.

A coluna utilizada neste estudo foi em fase reversa de 150 mm X 4,6 mm X 5 μm , que proporcionou uma melhor separação do analito de interesse, pois quanto menor o tamanho da partícula, mais eficiente é a separação. Para escolha da coluna é importante levar em conta o tamanho da partícula, porque controla o processo de difusão das moléculas da amostra ao penetrar e sair dos poros da partícula, isso acontece porque, à medida que se aumenta o tamanho da partícula, aumenta a profundidade dos poros, e conseqüentemente, o analito gasta mais tempo para sair desses poros profundos, e isso resulta no alargamento dos picos. Conforme diminui o tamanho da partícula, a profundidade dos poros também diminui e a saída do analito dos poros ocorre mais rapidamente, permitindo a obtenção de análises rápidas, picos mais resolvidos e não há perda de eficiência (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

A composição da fase móvel foi testada, avaliando-se a mistura metanol/água e acetonitrila/água em várias proporções desde 20% a 80%, tanto no modo isocrático, como gradiente. Para otimizar o tempo de análise sem comprometer a separação dos picos, o fluxo da fase móvel foi de 0,2 a 1,0 mL min⁻¹. Quando empregou-se metanol, a separação tornou-se impossível, pois o pico do hormônio 17 α -metiltestosterona apresentou alargamento, e com isso, perda da eficiência, e com acetonitrila/água, a separação do pico referente ao hormônio foi melhor.

A melhor condição para eluição foi feita no modo isocrático, neste caso o fluxo se manteve constante durante toda a análise, o que permitiu estabilidade dos parâmetros empregados na análise cromatográfica. No modo gradiente, variou-se o fluxo do eluente durante a análise, com isso houve perda da

estabilidade com freqüência, o que comprometeu a eficiência da separação cromatográfica.

Quando utilizou-se acetonitrila/água na proporção de 60:40 (v/v), a separação do pico referente ao hormônio 17 α -metiltestosterona foi boa, entretanto, o tempo de retenção foi de aproximadamente 5 minutos, e para análise das amostras ambientais, essa condição não foi ideal. Nos primeiros minutos da eluição tinha-se muitas impurezas que eluíram juntamente com o analito impossibilitando distinguir o pico do composto de interesse dos picos dos interferentes. Para solucionar o problema da co-eluição de interferentes com o analito, diminuiu-se a proporção da acetonitrila para que o hormônio tivesse mais interação com a fase estacionária. Nestas condições o hormônio eluiu depois de todas as impurezas, e isso ocorreu aproximadamente por volta dos 15 minutos.

Após alguns testes, as melhores condições cromatográficas determinadas para a análise do hormônio 17 α -metiltestosterona estão apresentadas na Tabela 03.

Tabela 03: Condições cromatográficas para a análise do hormônio 17 α -metiltestosterona.

Detector	UV-Vis
Coluna	C ₁₈ (octadesilsilano)
Fluxo da fase móvel	1,0 mL min ⁻¹
Comprimento de onda	245 nm
Volume injetado	20 μ L
Fase móvel	acetonitrila/água 35:65 (v/v)
Tempo de retenção	14,8 min
Temperatura	Ambiente

Foram consultadas algumas bibliografias para se obter os parâmetros iniciais das condições cromatográficas para a análise do hormônio (GONZALO-HUMBRELAS; IZQUIERDO-HORNILLOS, 2003; MARWAH; MARWAH; LARD, 2005; WASON et al., 2003).

Diferentes condições foram testadas para se obter uma boa separação e resolução do pico referente ao hormônio estudado. A melhor condição foi acetonitrila/água 35:65 (v/v), e o tempo de retenção do hormônio foi de aproximadamente 14,8 minutos e para esse tempo, foi feita uma média aritmética do tempo de eluição do composto de várias injeções.

A Figura 14 apresenta o cromatograma do padrão do hormônio 17 α -metiltestosterona na concentração 10 mg L⁻¹.

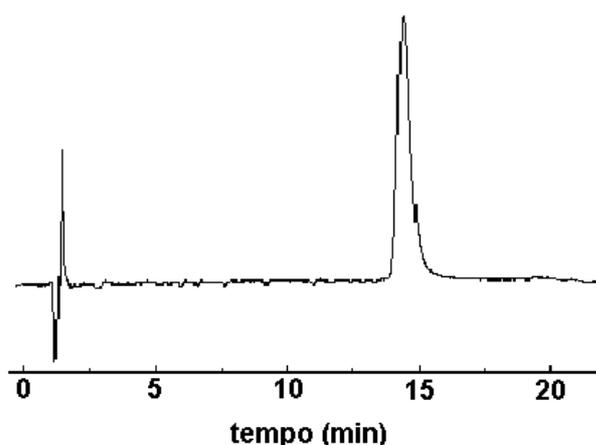


Figura 14: Cromatograma do padrão do hormônio 17 α -metiltestosterona na concentração 10 mg L⁻¹, utilizando como fase móvel acetonitrila/água 35:65 (v/v), fluxo de 1,0 mL min⁻¹, injeção de 20 μ L, coluna C₁₈ e comprimento de onda de 245 nm.

Verifica-se pelo cromatograma que o pico cromatográfico referente ao hormônio 17 α -metiltestosterona está bem definido.

6.5. Desenvolvimento da metodologia de extração do hormônio 17 α -metiltestosterona das amostras de água

Como não havia na literatura metodologia para a extração do hormônio 17 α -metiltestosterona das amostras de água e de sedimentos, alguns parâmetros foram verificados. Desde a escolha do adsorvente, etapa de condicionamento e

secagem do adsorvente, solvente extrator, quantidade do solvente extrator e solvente de reconstituição do analito.

Foram fortificadas algumas amostras de água com o hormônio 17α -metiltestosterona e procedeu-se a extração. Os extratos das amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência empregando para tanto a equação da curva analítica. A concentração do hormônio 17α -metiltestosterona foi determinada por meio da curva analítica.

Foram testados dois tipos de cartuchos com o intuito de se obter uma melhor recuperação:

- EFS C₁₈-500mg/3mL, da J. T. Bakerbond;
- EFS C₁₈-500mg/6mL, da J. T. Bakerbond.

A Figura 15 apresenta os resultados dos testes de recuperação do hormônio para os dois cartuchos.

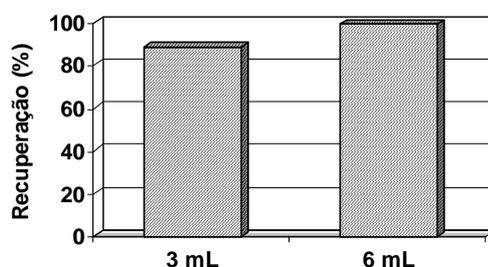


Figura 15: Porcentagens de recuperação do hormônio no nível de fortificação de 1 mg L^{-1} , utilizando para extração cartuchos com volumes de 3,0 e 6,0 mL com 500 mg de adsorvente.

Como verificado na Figura 15, o cartucho de 6,0 mL apresentou melhor recuperação.

Em relação aos solventes empregados para o condicionamento do cartucho, pode-se verificar que metanol/água 1:1 (v/v) apresentou uma melhor recuperação do analito quando comparado com os resultados empregando-se

metanol/água/metanol 1:1:1 (v/v), pelo fato de que metanol/água/metanol, não foi eficiente para ativar o adsorvente contido no cartucho.

Foram testados três tipos de solventes para a extração do analito: etanol, acetato de etila e acetona, como pode ser verificado pela Figura 16. A acetona apresentou uma boa recuperação, maior que 100%, apresentando efeito de matriz, o que possivelmente eluiu algum interferente juntamente com o hormônio 17α -metiltestosterona. O etanol foi o solvente mais eficiente na extração do analito em um menor volume.

A Figura 16 apresenta as porcentagens de recuperação do hormônio 17α -metiltestosterona, no nível de fortificação das amostras de 1 mg L^{-1} . Foram empregados diferentes solventes para a extração.

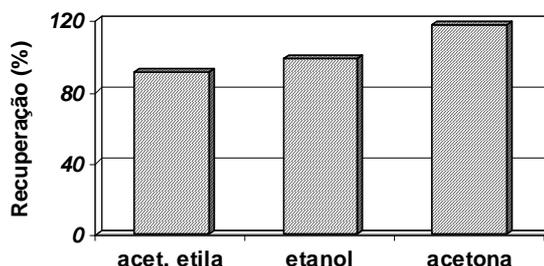


Figura 16: Porcentagens de recuperação do hormônio no nível de fortificação de 1 mg L^{-1} versus solventes utilizados na extração.

Testou-se quatro períodos de tempo de secagem do adsorvente contido na coluna de EFS: 15, 30, 45 e 60 minutos. Pode-se verificar que o período de tempo de secagem do adsorvente não mostrou muita variação na recuperação dos analitos. Todos os quatro períodos de tempo apresentaram valores aproximados de recuperação, entretanto, com o período de tempo de 45 minutos obteve uma maior recuperação. Portanto, empregou-se o período de tempo de 45 minutos para secagem do adsorvente empregado na extração, como observado na Figura 17.

A Figura 17 apresenta o tempo de secagem do adsorvente versus porcentagens de recuperação do hormônio 17 α -metiltestosterona no nível de fortificação de 1 mg L⁻¹.

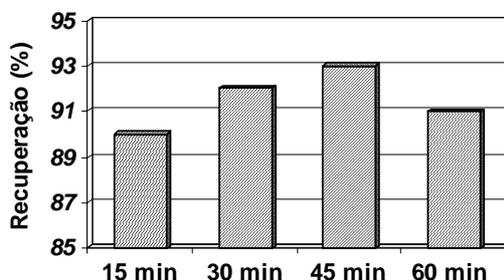


Figura 17: Tempo de secagem do adsorvente versus porcentagens de recuperação do hormônio no nível de fortificação de 1 mg L⁻¹.

Foram testados cinco diferentes volumes de solventes para a extração do analito: 2, 3, 4, 5 e 10 mL. Dentre eles, o volume de solvente que demonstrou maior recuperação do hormônio 17 α -metiltestosterona foi o de 5 mL. Observa-se pela Figura 18 que não houve variação significativa das porcentagens de recuperação do hormônio em função do volume de solvente empregado para a extração. Entretanto, para se ter maior certeza de que o analito foi totalmente eluído, usou-se o volume de 5 mL, que foi o volume que apresentou melhor recuperação.

A Figura 18 apresenta as porcentagens de recuperação do hormônio 17 α -metiltestosterona no nível de fortificação de 1 mg L⁻¹ utilizando diferentes volumes de solvente.

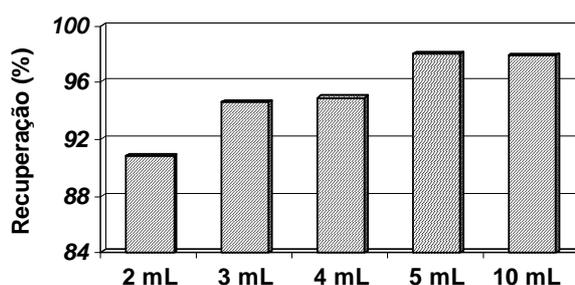


Figura 18: Porcentagens de recuperação do hormônio no nível de fortificação de 1 mg L⁻¹ versus volume de solvente utilizado para eluição.

O procedimento proposto para a extração do hormônio das amostras de água permitiu uma pré-concentração de 50 vezes. 10 mL de amostra de água fortificada com o hormônio foi extraída com EFS, resultando em 0,2 mL de extrato final. Para as amostras coletadas na piscicultura em Socorro-SP, o volume usado para a extração do hormônio com EFS foi de 300 mL, resultando em 0,2 mL de extrato final.

A concentração do analito nos tanques de pisciculturas foi muito baixa, pois foram adicionados aproximadamente 5 kg de ração por dia em cada tanque, com 30 a 60 mg do hormônio por quilo de ração, sendo que, cada tanque continha 200.000 L de água com taxa de renovação de 10% ao dia e aproximadamente 100.000 alevinos. A pré-concentração das amostras de água coletadas na piscicultura foi de 1500 vezes.

6.6. Validação da técnica analítica para a determinação do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras de água e de sedimentos

Os parâmetros de desempenho da técnica utilizada para a determinação do hormônio 17 α -metiltestosterona foram os seguintes: linearidade, sensibilidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. Foi desenvolvido e validado o método para a extração do hormônio das amostras de água. Foi também desenvolvido e validado o método de extração do hormônio 17 α -metiltestosterona das amostras de sedimentos.

Foi usada a mesma curva analítica para os dois procedimentos de extração.

6.6.1. Linearidade da curva analítica a ser usada para a determinação do hormônio nas amostras ambientais

Linearidade é a região do sistema de detecção no qual o sinal do detector é diretamente proporcional à concentração do analito. Para determinar a região linear como resposta analítica do detector para o hormônio estudado, no intervalo de 10,0 a 600,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, foi construído um gráfico de área em função da concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona.

Na Tabela 04 são apresentados os intervalo de concentração do hormônio estudado, equação de regressão linear e coeficiente de correlação (r) da curva analítica obtidos para o hormônio 17 α -metiltestosterona.

Tabela 04: Intervalo de concentração empregado para a determinação do hormônio 17 α -metiltestosterona, equação de regressão linear e coeficiente de correlação (r) do gráfico analítico (y= área cromatográfica e x= concentração).

Hormônio estudado	Intervalo ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação de regressão linear	Coeficiente de correlação (r)
17 α -metiltestosterona	10,0 a 600,0	$Y = 744,65813 + 33,1096 X$	$r = 0,99834$

O gráfico analítico obtido para o hormônio 17 α -metiltestosterona foi linear, apresentando coeficiente de correlação (r) superior a 0,99, que é recomendado pela ANVISA (2003) para a validação dos métodos analíticos. Esse valor é considerado bom, pois o coeficiente de correlação demonstra que a resposta do detector foi linear nos intervalos de concentração empregados nesse estudo.

Na Figura 19 está representada a curva analítica para o hormônio 17 α -metiltestosterona, sendo que cada ponto foi injetado em triplicata.

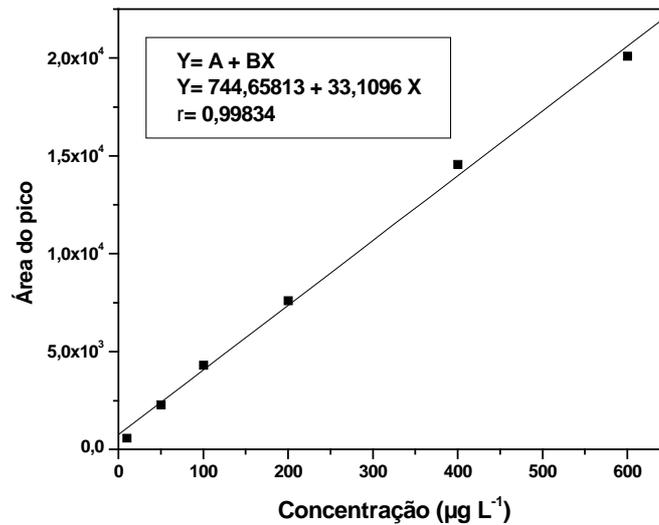


Figura 19: Curva analítica do hormônio 17 α -metiltestosterona.

6.6.2. Sensibilidade da técnica analítica para a determinação do hormônio 17 α -metiltestosterona presente nas amostras de água e de sedimentos

Da equação da reta, pôde-se estimar a sensibilidade da técnica, definida como dy/dx , que apresentou valor de 33,1096, que é considerado como sendo de sensibilidade alta. Do ponto de vista prático, a sensibilidade é o coeficiente angular do gráfico analítico. Uma técnica sensível é aquela que uma pequena diferença de concentração do analito causa uma grande variação no valor do sinal analítico.

6.6.3. Seletividade da técnica analítica para a determinação do hormônio 17 α -metiltestosterona presente nas amostras de água

Para testar a seletividade do método analítico foram analisados extratos do branco de água de nascente coletada na própria piscicultura. A água da nascente percorre aproximadamente 100 m até chegar aos tanques, sem ter contato com a água que contém o hormônio. No extrato do branco não foi observado pico referente ao hormônio, apenas sinais característicos do solvente e/ou impurezas no início do cromatograma, como pode-se observar na Figura 20.

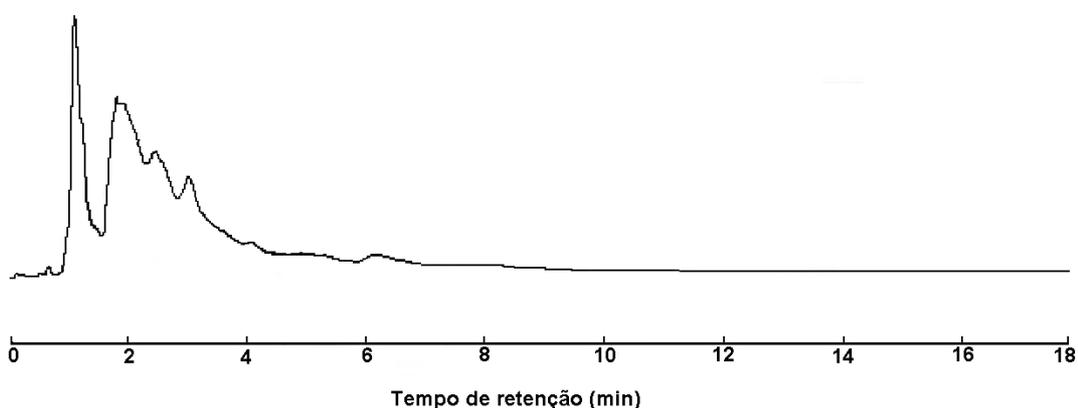


Figura 20: Cromatograma referente ao extrato do branco da água de nascente de piscicultura utilizando como fase móvel acetonitrila/água 35:65 (v/v), fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, injeção de $20 \mu\text{L}$, coluna C_{18} e comprimento de onda de 245 nm .

Observa-se pelo cromatograma da Figura 20, a ausência do pico referente ao hormônio 17α -metiltestosterona e de picos referentes a interferentes no mesmo tempo de retenção do hormônio, que foi de 14,8 minutos.

6.6.4. Precisão e exatidão do método para a determinação do hormônio 17α -metiltestosterona presente nas amostras de água

Os testes de precisão e ensaios de recuperação foram feitos em quintuplicata, em três níveis de concentração: $60,0$; $80,0$ e $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

A Tabela 05 apresenta as porcentagens de recuperação do hormônio 17α -metiltestosterona de amostras de água coletadas no Rio Santa Maria do Leme em São Carlos, para os três níveis de fortificação estudados.

Tabela 05: Porcentagens de recuperação do hormônio 17α -metiltestosterona de amostras de água coletadas no Rio Santa Maria do Leme em São Carlos para os três níveis de fortificação estudados.

Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)*	CV (%)
60	94 (90-104)	5,86
80	97 (88-109)	8,15
100	96 (89-104)	5,96

* média aritmética de (n=5) entre os valores de recuperação.
CV: coeficiente de variação

A Figura 21 apresenta três diferentes níveis de fortificação das amostras de água coletada no Rio Santa Maria do Leme em São Carlos versus recuperação média do hormônio 17α -metiltestosterona.

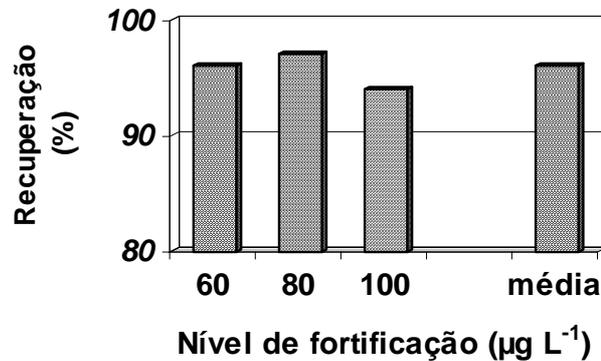


Figura 21: Porcentagem de recuperação do hormônio 17α -metiltestosterona versus níveis de fortificação das amostras de água e média das fortificações.

A exatidão do método foi determinada como recuperação média, que é definida como a proporção da concentração da substância de interesse que foi extraída e possível de ser quantificada (RIBANI et al., 2004). A precisão foi avaliada através do desvio padrão relativo, ou coeficiente de variação (CV) de uma série de medidas (ANVISA, 2003), neste caso ($n=5$), ao nível de repetitividade, sendo portanto, feita em um curto intervalo de tempo.

A recuperação média obtida para o hormônio 17α -metiltestosterona foi de 96%. A porcentagem de recuperação encontrada neste estudo está de acordo com os valores encontrados por Xie et al. (2005), em estudo da determinação do hormônio 17α -metiltestosterona em amostras de peixes, que foram de 88 a 113%. Os resultados encontrados para a exatidão do método são concordantes com os critérios estabelecidos pela ANVISA (2003) (recuperação média 70-120%), sendo, portanto, considerado exato como apresentado pela literatura (RIBANI et al., 2004; BRITO et al., 2003). A exatidão refere-se à concordância entre a

concentração do analito na solução padrão e a encontrada no procedimento analítico.

Para o estudo da precisão, os intervalos dos coeficientes de variação são considerados adequados até $\pm 20\%$, dependendo da complexidade da amostra (RIBANI et al., 2004). Para este método, os coeficientes de variação variaram de 5,86 a 8,15, e foram inferiores aos valores apresentados por Ribani et al, (2004), sendo portanto, considerado preciso, e dentro da faixa aceitável para a validação de métodos analíticos (RIBANI et al., 2004). Para aumentar a precisão do método deve-se aumentar o número de replicatas.

6.6.5. Limite de detecção e limite de quantificação determinados para as amostras de água

A legislação brasileira (BRASIL, 2004) e CONAMA (2005) não estabelecem limites de detecção e de quantificação para hormônios, como o 17α -metiltestosterona.

A metodologia utilizada neste estudo pode fornecer resultados que poderão ser divulgados na literatura.

O limite de detecção é a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas (CURRIE, 1999).

Para as amostras de água, o limite de detecção foi de $11,7 \mu\text{g L}^{-1}$, e o limite de quantificação foi de $35,1 \mu\text{g L}^{-1}$. Estes valores não foram suficientemente

baixos para a determinação do hormônio nas amostras ambientais. Foi necessário o procedimento de adição de padrão.

6.7. Avaliação do método de extração do hormônio 17 α -metiltestosterona presente em amostras de sedimentos

Os resultados da validação da metodologia de extração do hormônio 17 α -metiltestosterona das amostras de água foram utilizados como ponto de partida para o desenvolvimento da metodologia de extração do hormônio 17 α -metiltestosterona das amostras de sedimentos.

Como parâmetro orientador utilizou-se o trabalho descrito por Babic, Petrovic e Kastelan-Macan (1998), onde os autores utilizaram o equipamento de ultra-som para extrair pesticidas de sedimentos. Este procedimento está descrito no item 5.10.2.1.

6.7.1. Estudo da recuperação do hormônio 17 α -metiltestosterona presente nas amostras de sedimentos forticadas: determinação do melhor solvente para a extração

Primeiramente, foi testada a mesma metodologia de extração de estrógenos presentes em amostras de sedimentos e de água (ALDA; BARCELÓ, 2001b), entretanto este procedimento não apresentou boa reprodutividade e optou-se pela adaptação de outra metodologia descrita por Babic, Petrovic e Kastelan-Macan (1998), que fez a determinação de pesticidas em amostras de solos.

Para o desenvolvimento de um método de extração do hormônio 17 α -metiltestosterona que fosse eficiente nas amostras de sedimentos foram

feitos testes de recuperação do hormônio usando três solventes: etanol, acetato de etila e acetona, como descrito anteriormente.

A Figura 22 apresenta os resultados das extrações do hormônio 17 α -metiltestosterona no nível de fortificação 200,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, feitas em triplicada com diferentes solventes.

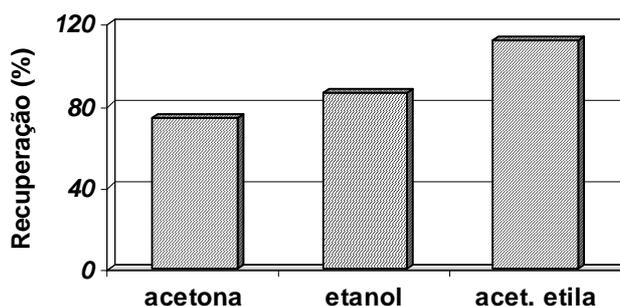


Figura 22: Recuperação versus solvente utilizado na extração do hormônio 17 α -metiltestosterona presente nas amostras de sedimentos.

Como foi observado pelos dados da Figura 22, os valores da taxa de recuperação foram bons, pois estão dentro dos limites aceitáveis para a análise de resíduos de contaminantes ambientais (70-120%) (RIBANI et al., 2004).

Quando empregou-se acetato de etila como solvente extrator, a recuperação foi maior, mas ocorreu efeito de matriz, pois interferentes eluíram juntamente com o analito de interesse e isso dá a impressão de que se recuperou mais do que o esperado. Esse efeito pode ser observado em outras técnicas analíticas. O efeito de matriz é influenciado por vários fatores tais como, características físicas e químicas do analito de interesse, natureza da matriz, razão da quantidade do analito/matriz e o sistema cromatográfico (BRITO et al., 2002). Então, o solvente que apresentou a melhor recuperação quando analisou-se as amostras de sedimentos foi o etanol (86,63%). Essa porcentagem está dentro do limite aceitável e nesse caso não ocorreu o efeito de matriz.

6.7.2. Seletividade da análise do hormônio nas amostras de sedimentos

Na Figura 23 apresenta o cromatograma de extração do branco do hormônio. Para determinar a seletividade coletou-se amostras de sedimentos no Rio Santa Maria do Leme em São Carlos.

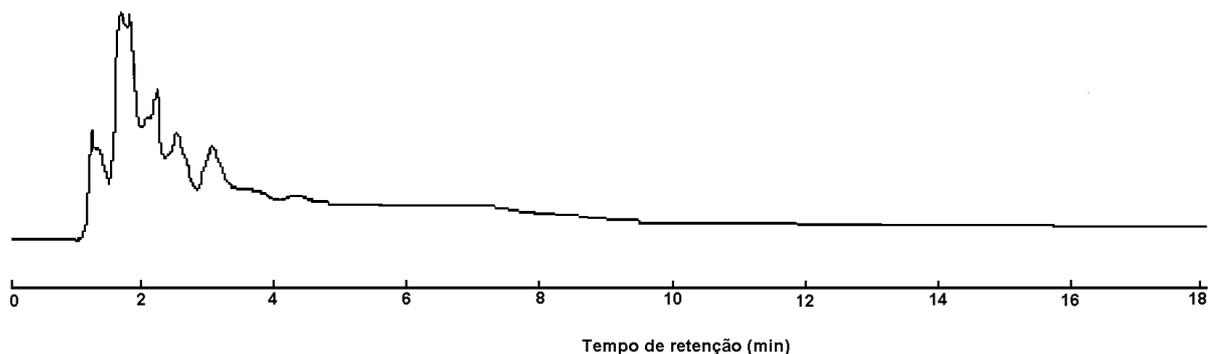


Figura 23: Cromatograma do branco dos sedimentos utilizando como fase móvel acetonitrila/água 35:65 (v/v), fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, injeção de $20 \mu\text{L}$, coluna C_{18} e comprimento de onda de 245 nm .

Como observado na Figura 23, não foi encontrado o hormônio nas amostras dos sedimentos coletados no Rio Santa Maria do Leme-São Carlos/SP, este parâmetro foi utilizado para mostrar que o procedimento de extração é seletivo.

6.7.3. Precisão e exatidão para as extrações do hormônio 17α -metiltestosterona das amostras de sedimentos

Após chegar a conclusão de que o etanol é o melhor solvente extrator. Foram feitos estudos de recuperação do hormônio 17α -metiltestosterona usando três concentrações: $300,0$; $400,0$ e $500,0 \mu\text{g Kg}^{-1}$, seguindo o procedimento descrito na seção 5.10.2.1. A extração foi feita em quintuplicata.

A Tabela 06 apresenta a porcentagem de recuperação do hormônio nas amostras de sedimentos.

Tabela 06: Resultados da recuperação do hormônio 17 α -metiltestosterona presente nas amostras de sedimentos.

Nível de fortificação ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Recuperação* (%)	CV (%)
300,0	72 (68-76)	4,05
400,0	76 (72-83)	6,84
500,0	81 (75-86)	5,16

* é a média aritmética (n=5) entre os valores de recuperação.

A Figura 24 apresenta os três níveis de fortificação das amostras de sedimentos com o hormônio 17 α -metiltestosterona versus as porcentagens de recuperação e média das recuperações.

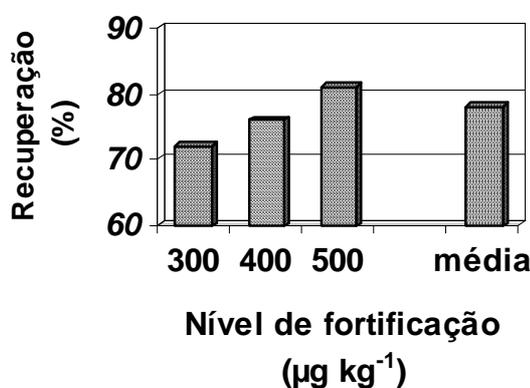


Figura 24: Recuperação do hormônio 17 α -metiltestosterona versus nível de fortificação das amostras dos sedimentos.

A média da recuperação do hormônio 17 α -metiltestosterona das amostras de sedimentos fortificadas foi cerca de 78%, isso indica que o método empregado é apropriado para a análise do hormônio presente em amostras de sedimentos, pois o valor encontrado está dentro dos limites aceitáveis de recuperação para análise de resíduos presentes em amostras ambientais, que é entre 70 a 120% (ANVISA, 2003). Porém dependendo da complexidade da amostra, a faixa de recuperação pode ser de 50 a 120% (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). As porcentagens de recuperação evidenciaram que, o método pode ser considerado exato. A precisão foi avaliada através do coeficiente de variação (CV) dos

resultados obtidos (n=5), apresentando valores de 4,05 a 6,84, inferiores a 20% para este método, sendo portanto, considerado preciso.

Conforme observado por Marwah, Marwah e Lardy (2005), em estudos de extração do hormônio 17 α -metiltestosterona presente em ração para peixes, quanto maior a concentração do hormônio na matriz, maior a porcentagem de recuperação.

6.7.4. Limite de detecção e quantificação determinados para as amostras de sedimentos

Na análise do hormônio presente nas amostras de sedimentos, o limite de detecção (LD) foi de 45 $\mu\text{g kg}^{-1}$, e o limite de quantificação (LQ) foi de 135 $\mu\text{g Kg}^{-1}$. Em algumas amostras foram necessárias a adição de padrão, apesar de que a maioria das amostras, estes valores foram suficientes para a determinação do hormônio.

6.8. Determinação do hormônio 17 α -metiltestosterona em amostras de água

6.8.1. Utilização do método proposto para a determinação do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras de água de piscicultura

Após o método ser desenvolvido e validado, foi aplicado para determinar a concentração do hormônio nas amostras de água dos tanques de piscicultura, objeto deste estudo.

Para o estudo proposto foram feitas duas coletas, sendo uma no mês de janeiro e outra no mês de abril. Não foi possível coletar as amostras nos mesmos tanques nas duas coletas, porque no manejo do estabelecimento pesqueiro, é

feito o revezamento de tanques, então coletou-se amostras de água em três tanques no mês de janeiro e em três no mês de abril. O tanque 15 foi o único que foi amostrado nas duas coletas.

Os valores obtidos *in situ* para os parâmetros físicos e químicos da água, temperatura, pH, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido foram determinados nas duas coletas.

Os parâmetros determinados na primeira coleta estão apresentados nas Figuras 25 e 26 e os parâmetros encontrados na segunda coleta, estão apresentados nas Figuras 30 e 31, localizados na página 100. Foram determinados outros parâmetros como presença de amônia e coliformes fecais, empregando testes e fitas semi-quantitativas.

A equação da reta para o hormônio foi $Y = 744,65813 + 33,1096 X$, e a concentração (X) foi de $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ em $200 \mu\text{L}$ de solução. Como foi percolado um volume de $300,0 \text{ mL}$, a quantidade em massa do hormônio nesse volume é o mesmo, entretanto para 1 litro da amostra a concentração passa a ser $0,003 \mu\text{g L}^{-1}$. Esta é apenas a demonstração de como foram feitos os cálculos para se chegar na concentração apresentada nos gráficos das Figuras 27-29, nas páginas 97-98 e das Figuras 32 e 33, nas páginas 102 e 103.

Entretanto, como a concentração do hormônio 17α -metiltestosterona presente nas amostras de água coletada na piscicultura encontra-se abaixo dos limites de detecção e de quantificação. Só foi possível sua quantificação pela adição de padrão.

6.8.2. Parâmetros físicos e químicos da água dos tanques empregados para a coleta feita no mês de janeiro (primeira coleta)

Foram avaliados os parâmetros físicos e químicos da água dos tanques de piscicultura e os dados referentes a pH, oxigênio dissolvido, condutividade e temperatura, estão dispostos nas Figura 25 e 26.

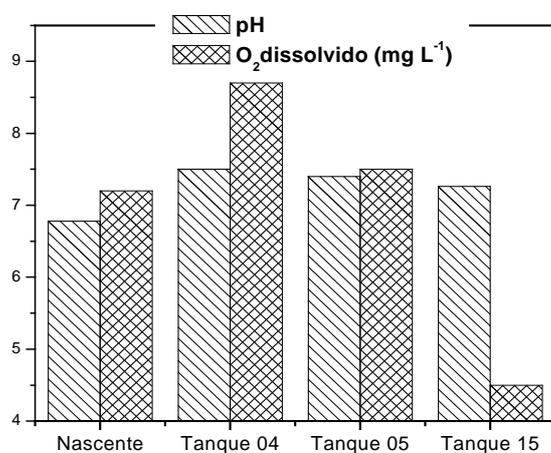


Figura 25: pH e oxigênio dissolvido da água dos tanques no momento da coleta.

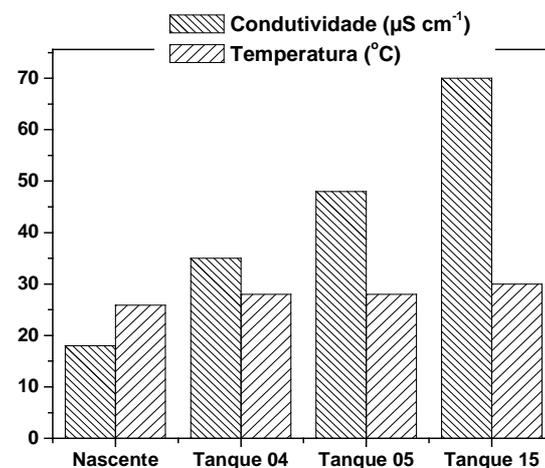


Figura 26: Condutividade e temperatura da água dos tanques no momento da coleta.

Os valores de oxigênio dissolvido da água dos tanques no momento da coleta ficaram acima dos estabelecidos pela resolução CONAMA 357/2005, que é de $\geq 6 \text{ mg L}^{-1}$ para rios de classe 1, e $\geq 5 \text{ mg L}^{-1}$ para rios de classe 2, com exceção das amostras coletadas no tanque 15, que apresentou o valor de $4,5 \text{ mg L}^{-1}$ de OD. Esse resultado está um pouco baixo, isso justifica-se pelo fato deste tanque receber todo o efluente dos outros tanques aumentando assim a quantidade de material orgânico dissolvido, proveniente da ração e das fezes dos peixes e outros.

A baixa concentração de oxigênio dissolvido do tanque 15 pode ser considerada como real indicador da quantidade de matéria orgânica presente no tanque.

Os valores de pH ficaram dentro da faixa de neutralidade, com uma ligeira tendência à pH básico, de 7,3 a 7,5. O pH de todos os tanques ficaram dentro dos valores estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/2005 e pela Portaria 518, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004).

A condutividade elétrica da água é determinada pela presença de substâncias dissolvidas que se dissociam em ânions ou cátions, tendo a capacidade da água de transmitir a corrente elétrica (MACÊDO, 2004). A água do tanque 15 apresentou um alto valor de condutividade elétrica $70 \mu\text{S cm}^{-1}$. A condutividade elétrica para águas de ambientes lóticos não contaminados deve ficar entre 6 a $30 \mu\text{S cm}^{-1}$ (PELÁEZ-RODRÍGUEZ et al., 2002).

Pode-se observar na coleta feita no mês de janeiro, que os valores da condutividade da água aumentaram em direção à foz e que os valores do oxigênio dissolvido diminuíram, exemplificando bem o fato de haver descarga de efluente de um tanque em outro.

A amônia (NH_3) é um metabólito proveniente da excreção nitrogenada de peixes e outros organismos aquáticos e da decomposição microbiana de resíduos orgânicos, como restos de alimento, fezes, entre outros (KUBITZA, 1999). A maior parte da amônia presente nos tanques vem da excreção dos peixes, e ela é altamente tóxica (BOYD, 1990). Segundo o mesmo autor, a produção de amônia é diretamente proporcional à quantidade de alimento oferecida aos peixes.

Kubitza (1999) relatou que níveis de amônia entre 0,7 e $2,4 \text{ mg L}^{-1}$ podem ser letais para peixes quando expostos por curto período de tempo. A quantidade

de amônia foi de $0,75 \text{ mg L}^{-1}$ para a água de todos os tanques. Entretanto, esses valores fornecem apenas uma idéia, pois o teste foi feito com Kit não quantitativo de qualidade da água, fornecido pelo CDCC. O teste com fitas foi feito para coliformes fecais, e os resultados foram positivos, mas aceitáveis, pois se trata do cultivo de um grande número de alevinos, as quais consomem uma grande quantidade de ração.

Segundo Kubitza (1999), a utilização de ração faz com que o alimento que não é metabolizado pelos peixes, seja excretado dentro do próprio ambiente de cultivo, e estas fezes se decompõem por ação biológica, consumindo oxigênio e liberando nutrientes na água. Quanto melhor a digestibilidade do alimento, menor será a quantidade de resíduos fecais excretada.

6.8.3. Quantificação do hormônio 17α -metiltestosterona nas amostras de água coletadas na piscicultura no mês de janeiro

Os resultados referentes à primeira coleta de água na piscicultura de Socorro são apresentados nas Figuras 27-29 e na Tabela 07.

6.8.3.1. Resultado da análise do hormônio 17α -metiltestosterona nas amostras de água do tanque 04

A Figura 27 apresenta o gráfico da concentração do hormônio 17α -metiltestosterona presente nas amostras de água coletadas na entrada, no centro e na saída do tanque 04.

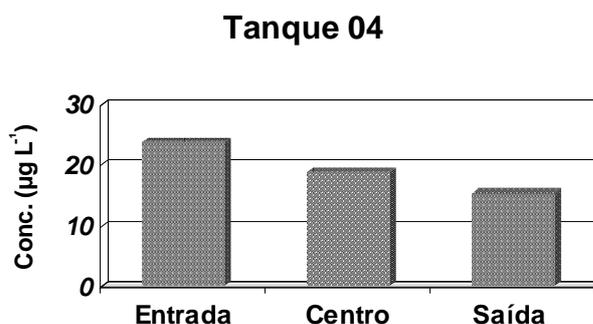


Figura 27: Concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona encontrada nas amostras de água do tanque 04.

Verifica-se pelos resultados que a concentração do hormônio encontrada nesse tanque está de acordo com a sua condição de manejo, pois a coleta foi feita após o quarto dia de início da aplicação da ração contendo o hormônio.

Cerca de 99% do hormônio é metabolizado em poucos dias (PANDIAN; SHEELA, 1995). Entretanto em seu estudo, Marwah, Marwah e Lardy (2005), verificaram que em pH neutro, a degradação do hormônio é lenta e por isso, acredita-se que a presença do hormônio está relacionada com o pH. O pH neste tanque foi de 7,5, se estivesse em pH ácido ou básico, possivelmente não seria encontrado o hormônio, e sim seus produtos de degradação.

A quantificação do hormônio nos três pontos de coleta deste tanque, foi possível pela técnica de adição de padrão, uma vez que a concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona ficou abaixo do limite de quantificação da técnica.

6.8.3.2. Resultado da análise do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras de água do tanque 05

A Figura 28 apresenta o gráfico da concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona presente nas amostras de água coletadas na entrada, no centro e na saída do tanque 05.

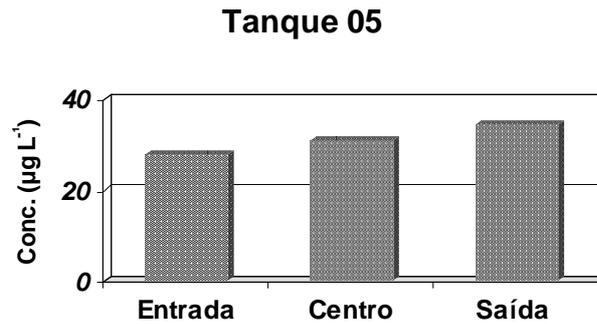


Figura 28: Concentração do hormônio 17α -metiltestosterona encontrada nas amostras de água do tanque 05.

A concentração do hormônio 17α -metiltestosterona nas amostras coletadas neste tanque justifica-se pelo fato dele estar recebendo a ração contendo o hormônio por 20 dias. Possivelmente a ração oferecida aos peixes não foi totalmente consumida, e isso pode ter influenciado no aumento da concentração do hormônio.

Outro fator que pode ter influenciado nos resultados do aumento da concentração do hormônio é que este tanque recebe o efluente do tanque 04, por isso a concentração encontrada na saída foi maior do que no ponto de entrada.

6.8.3.3. Resultado da análise do hormônio 17α -metiltestosterona nas amostras de água do tanque 15

A Figura 29 apresenta o gráfico da concentração do hormônio 17α -metiltestosterona presente nas amostras de água coletadas na entrada, no centro e na saída do tanque 15.

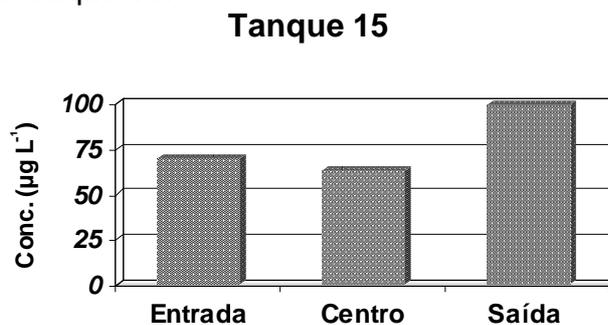


Figura 29: Concentração do hormônio 17α -metiltestosterona encontrada nas amostras de água do tanque 15.

Todos os peixes do tanque 15 haviam passado pela fase de reversão sexual, entretanto, este tanque é o ponto de ligação entre todos os outros tanques e o ribeirão dos Machados. Neste tanque são dispostos os efluentes dos outros tanques, por isso, ocorreu aumento da concentração do hormônio no ponto de saída do mesmo. As amostras deste tanque apresentaram a maior concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona quando comparado com os resultados dos outros tanques amostrados. Isso justifica-se, possivelmente, pelo fato das partículas de ração não consumida estarem presentes nas amostras.

A Tabela 07 apresenta os resultados da concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras de água dos três tanques amostrados na coleta feita no mês de janeiro.

Tabela 07: Resultados da concentração do hormônio nas amostras de água dos três tanques amostrados na coleta feita no mês de janeiro.

Tanques coletados	Concentração do hormônio $\mu\text{g L}^{-1}$		
	Entrada	Centro	Saída
Tanque 04	24,5	19,5	15,5
Tanque 05	29,0	31,0	34,5
Tanque 15	70,5	63,5	99,5

6.8.4. Parâmetros físicos e químicos da água dos tanques empregados para a coleta feita no mês de abril (segunda coleta)

Nesta coleta foram avaliados os fatores físicos e químicos da água. Os dados referentes a pH, oxigênio dissolvido, condutividade e temperatura determinadas na coleta feita em abril, estão dispostos nas Figura 30 e 31.

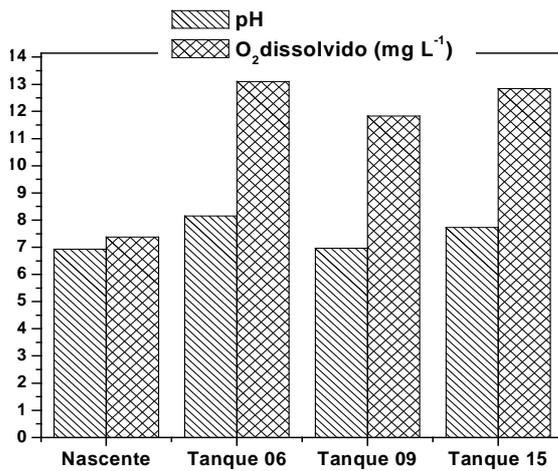


Figura 30: pH e oxigênio dissolvido da água dos tanques no momento da coleta.

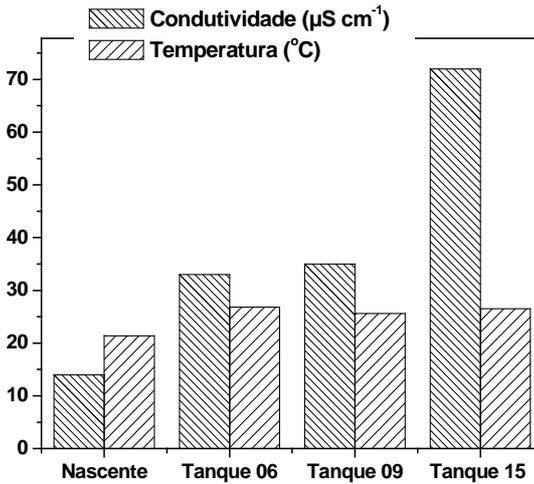


Figura 31: Condutividade e temperatura da água dos tanques no momento da coleta.

Os maiores valores de oxigênio dissolvido da água da piscicultura foram registrados nesta segunda coleta e a temperatura foi menor do que a encontrada na primeira coleta. Temperaturas baixas favoreceram a dissolução do oxigênio na água.

Os valores de pH estavam dentro dos critérios estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/2005, que é de 6,0 a 9,0. Os valores encontrados neste trabalho foram de 6,78 a 8,15. Segundo Kubitzka (1999), os valores de pH podem variar durante o dia em função da atividade fotossintética e respiratória das comunidades aquáticas, diminuindo em função do aumento na concentração de gás carbônico presente na água, que ocasiona o abaixamento do pH.

Não foi observado o aumento da condutividade da água dos tanques amostrados em direção à foz, como ocorreu na coleta feita no mês de janeiro, pois nem todos os tanques estavam sendo submetidos ao tratamento com o hormônio. Os tanques em que os peixes estavam sendo revertidos sexualmente, já se encontravam em fase final do processo.

Foram feitos testes qualitativos para a amônia, e os valores encontrados para a amônia foram de 0,75 mg L⁻¹ no tanque 09, e nos tanques 06 e 15, os valores foram os mesmos, 0,25 mg L⁻¹. Segundo Kubitza (1999), a concentração de amônia acima de 0,2 mg L⁻¹ já é suficiente para induzir uma toxidez crônica, levando a uma diminuição do crescimento e intolerância dos peixes às doenças.

O procedimento não quantitativo, ou seja, testes com fitas foram feitos para coliformes fecais, e os resultados foram positivos, mas aceitáveis para o caso de tanques de criação de peixes. Pois trata-se do cultivo de um grande número de alevinos, os quais consomem uma grande quantidade de ração e excretam também uma considerável quantidade de resíduos fecais. Com a baixa taxa de renovação de água, em torno de 10% há pouca dispersão dos resíduos.

6.8.5. Quantificação do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras de água coletadas na piscicultura no mês de abril

Os resultados referentes à segunda coleta de água na piscicultura de Socorro são apresentados nas Figuras 32 e 33, e na tabela 08.

6.8.5.1. Resultado da análise do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras de água do tanque 06

A Figura 32 apresenta o gráfico da concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona presente nas amostras de água coletadas na entrada, no centro e na saída do tanque 06.

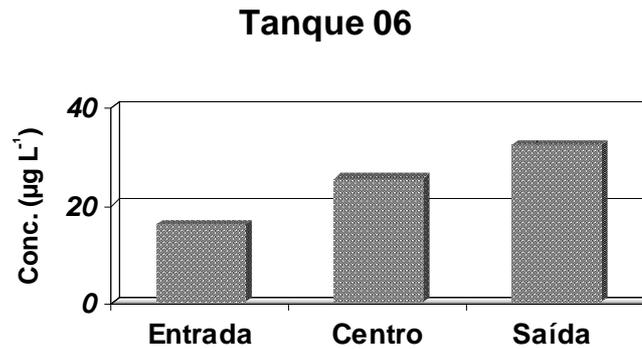


Figura 32: Concentração do hormônio 17α -metilttestosterona encontrada nas amostras de água do tanque 06.

A concentração do hormônio na entrada e na saída do tanque 06 foi bem distinta, pois, este tanque não recebia efluentes de outros tanques. A concentração do hormônio neste tanque foi proveniente da ração que foi oferecida aos alevinos. O aumento da concentração do hormônio presente nas amostras de água coletadas no ponto de saída se deve possivelmente ao fato de que o hormônio presente na ração no próprio tanque, não foi totalmente consumida pelos alevinos e, possivelmente, devida a aplicação do hormônio por vários dias, havendo o acúmulo do hormônio no ponto de saída.

6.8.5.2. Resultado da análise do hormônio 17α -metilttestosterona nas amostras de água do tanque 09

Não foi encontrado o hormônio 17α -metilttestosterona na água do tanque 09, pois a concentração do referido hormônio provavelmente está abaixo do limite de detecção da técnica, não sendo portanto quantificado, nem mesmo com a adição de padrão.

A reversão sexual neste tanque já havia sido terminada há 11 dias no momento da coleta das amostras.

6.8.5.3. Resultado da análise do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras de água do tanque 15

A Figura 33 apresenta o gráfico da concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona presente nas amostras de água coletadas na entrada, no centro e na saída do tanque 15.

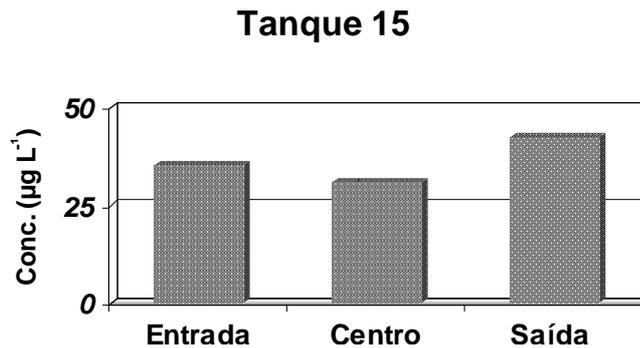


Figura 33: Concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona encontrada nas amostras de água do tanque 15.

Os peixes do tanque 15 já haviam passado pelo tratamento com hormônio e portanto, não estavam na fase de reversão sexual. Os peixes deste tanque estavam sendo tratados com ração sem adição do hormônio, segundo os funcionários da piscicultura. Entretanto, isso não ficou evidente, pelo fato da concentração do hormônio ter sido maior quando comparado com os resultados do tanque 06.

A alta concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona encontrada nesse tanque pode ser justificada pelo fato do interligamento dos tanques. Este tanque recebe a água de todos os tanques e, a partir deste, a água é descartada sem tratamento prévio, no Ribeirão dos Machados, que deságua no Rio dos Peixes, que é um dos afluentes do Rio Mogi-Guaçu.

A Tabela 08 apresenta os resultados da concentração do hormônio 17α -metiltestosterona nas amostras de água dos três tanques amostrados na coleta feita no mês de abril.

Tabela 08: Resultados da concentração do hormônio nas amostras de água dos três tanques amostrados na coleta feita no mês de abril.

Tanques coletados	Concentração do hormônio $\mu\text{g L}^{-1}$		
	Entrada	Centro	Saída
Tanque 06	16,0	25,5	32,5
Tanque 09	n.d.	n.d.	n.d.
Tanque 15	35,5	31,0	42,5

n.d.= não detectado

6.8.6. Comentários sobre a presença do hormônio 17α -metiltestosterona nas amostras de água de piscicultura

Na Figura 34 é apresentado o cromatograma referente à análise da água coletada no tanque 06 no mês de abril.

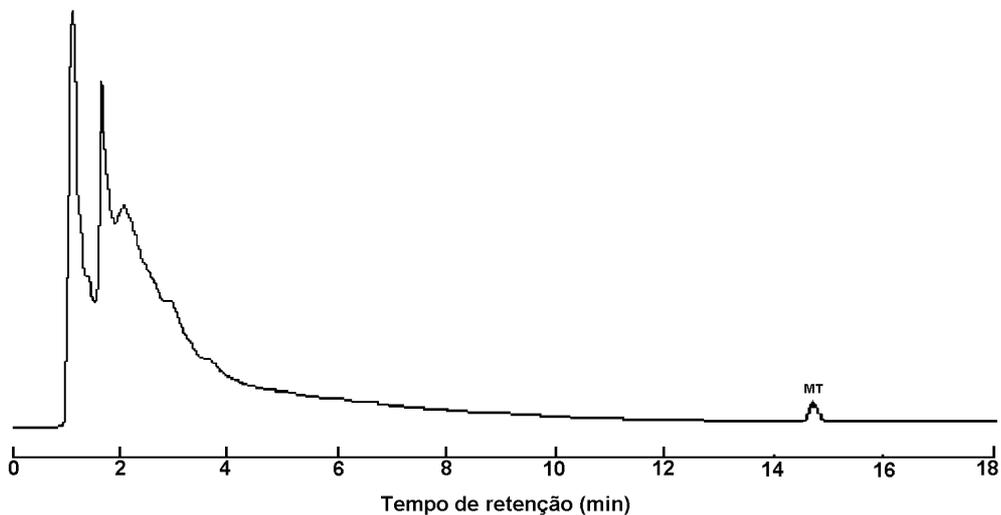


Figura 34: Cromatograma do hormônio presente nas amostras coletadas no tanque 06, no mês de abril, nesse caso foi feita a adição de padrão.

Como pode ser observado pela Figura 34, ocorreu visivelmente o aparecimento do pico referente ao hormônio por volta de 15 minutos. Para que ocorresse a visualização do pico, foi necessário utilizar a adição de padrão em

todas as amostras coletadas na piscicultura, pois a concentração do hormônio na água é muito baixa, e sem o procedimento de adição de padrão, não seria possível a quantificação do hormônio.

A quantidade adicionada de hormônio em cada tanque é de 30 a 60 mg por quilo de ração, cada tanque contém 200 mil litros de água, com taxa de renovação de 10% ao dia, e são adicionados aproximadamente cinco quilos de ração por dia na fase que está sendo feita a reversão sexual, tendo portanto uma baixa concentração do hormônio decorrente do volume de água do tanque.

Para a quantificação do hormônio nas amostras de água foram utilizadas três formas, pelo tempo de retenção, pela adição do padrão na amostra e pelo espectro de UV-Vis, o que torna bem provável, que o pico encontrado nas amostras seja referente ao hormônio 17α -metiltestosterona.

Observa-se pela Figura 34, que no início do cromatograma aparecem picos bem definidos, possivelmente atribuídos a compostos presentes na ração. Isto pode ser verificado pelo cromatograma do extrato da ração, apresentado na Figura 35.

O pico do hormônio 17α -metiltestosterona não foi observado no cromatograma do extrato da ração, como pode ser observado na Figura 35. Isso deveu-se ao fato de sua concentração ser muito pequena e neste caso não foi feita a adição de padrão, pois o intuito deste procedimento de extração foi somente verificar a presença de picos atribuídos à ração, que aparecem no início do cromatograma, conforme observado na Figura 35.

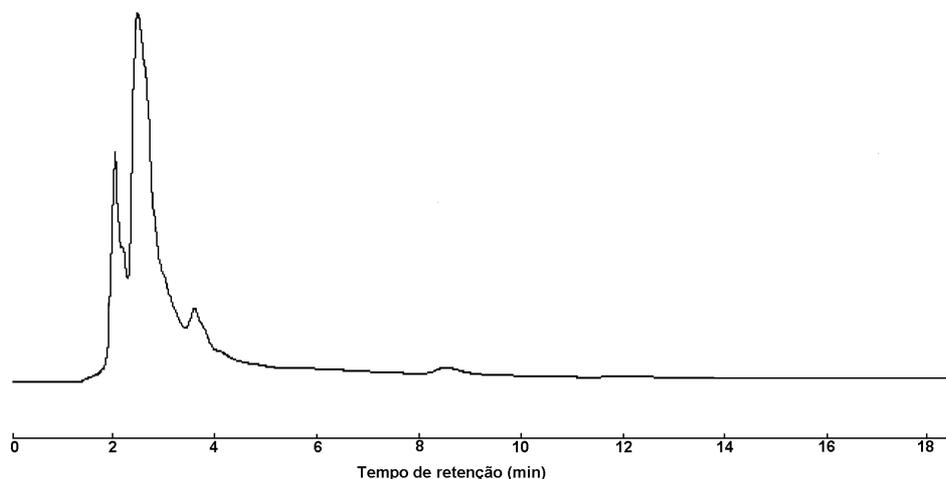


Figura 35: Cromatograma referente ao extrato da ração de peixes com hormônio.

O 17α -metiltestosterona é praticamente insolúvel na água e isso pode ser observado pela sua concentração encontrada na água dos tanques da piscicultura nas duas coletas. É possível que o hormônio fique agregado nos sedimentos, podendo afetar os organismos presentes no meio.

A quantificação do hormônio 17α -metiltestosterona presente nas amostras de água da piscicultura tornou-se difícil pelo fato da concentração depender diretamente do número de alevinos alimentados, da frequência e quantidade de ração oferecida a eles e também da taxa de renovação de água dos tanques. Entretanto, a taxa de recuperação do hormônio foi ideal para a determinação deste composto em amostras de água.

6.9. Determinação do hormônio 17 α -metiltestosterona em amostras de sedimentos

6.9.1. Utilização do método proposto para a determinação do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras de sedimentos da piscicultura

Como os sedimentos acumulam em sua maioria substâncias orgânicas, como explosivos, pesticidas, dentre outras (TAVARES et al., 1996; FALONE; VIEIRA; ONUSKA, 2006), foi feita a determinação do teor de matéria orgânica dos sedimentos dos tanques da piscicultura, pois sabe-se que moléculas orgânicas geralmente são adsorvidas na matéria orgânica.

A granulometria foi feita para verificar a porcentagem de silte e argila dos sedimentos já que estas partículas possivelmente podem reter algumas moléculas orgânicas (BAIRD, 2002).

6.9.2. Determinação da porcentagem de matéria orgânica dos sedimentos de piscicultura via calcinação (pesagem)

Determinou-se o teor de matéria orgânica dos sedimentos, pois sabe-se que moléculas orgânicas podem ser adsorvidas nesta fração de sedimentos.

Segundo Esteves (1988), os teores de matéria orgânica de sedimentos acima de 10% do peso seco, são considerados orgânicos, e abaixo de 10% são considerados inorgânicos ou minerais, com predominância de sílica, argila e compostos como cálcio, ferro e manganês.

A Tabela 09 contém os resultados encontrados para os teores de matéria orgânica dos sedimentos estudados.

Tabela 09: Porcentagem de matéria orgânica dos sedimentos dos tanques de piscicultura e dos sedimentos coletado para estudo de recuperação.

Local da coleta	Porcentagem (%)
Santa Maria do Leme (sedimentos de recuperação)	5,3
Tanque 04 (1ª coleta)	5,3
Tanque 05 (1ª coleta)	3,3
Tanque 15 (1ª coleta)	12,7
Tanque 06 (2ª coleta)	4,7
Tanque 09 (2ª coleta)	10,0
Tanque 15 (2ª coleta)	3,3

Os sedimentos do tanque 15 da primeira e da segunda coleta, e os do tanque 09 apresentaram valores superiores ou igual a 10% de matéria orgânica, sendo portanto considerados sedimentos orgânicos. Os sedimentos dos outros tanques apresentaram valores inferiores a 10% de matéria orgânica, sendo considerados, portanto inorgânicos. Os menores teores de matéria orgânica foram encontrados nos Tanques 05 e 15 da segunda coleta, caracterizando esses sedimentos como inorgânicos.

Pelos resultados da Tabela 09 é possível afirmar que existe variabilidade na quantidade de matéria orgânica entre os pontos de coleta, isso pode ser devido ao tipo dominante das frações dos sedimentos, como: textura dos sedimentos, tamanho das partículas ou matéria orgânica incrementada pela morte e deposição de plantas e animais que utilizaram esse substrato como fonte de alimentação e sobrevivência, e também, os restos de ração e fezes dos peixes ali depositados.

A quantidade de matéria orgânica dos tanques pode variar ao longo de um período, visto que a pluviosidade e a taxa de renovação das águas podem contribuir intensamente na dissociação e transporte de matéria orgânica, bem como pela quantidade de animais mortos depositados e ração consumida e não-

consumida. Isto pode ser confirmado pelos teores de matéria orgânica encontrados nos tanques 15 da primeira e da segunda coleta, que apresentaram valores diferentes.

6.9.3. Porcentagem de granulometria dos sedimentos coletados no rio Santa Maria do Leme e dos sedimentos coletados nos tanques da piscicultura (%)

A análise granulométrica determina a distribuição percentual das partículas primárias, servindo assim, como um importante fator na identificação de sedimentos.

Os sedimentos são de grande importância ambiental porque é o local onde se depositam muitas substâncias químicas, tanto orgânicas, como inorgânicas.

As partículas orgânicas ou inorgânicas decantam-se no fundo dos lagos tornando-se enterradas quando outros sedimentos acumulam-se sobre as mesmas. Este “túmulo” representa depósito de muitos poluentes presentes na água. Antes das partículas serem cobertas por camadas subseqüentes de sedimentos, a matéria recém-depositada no fundo de um corpo aquático pode contaminar novamente a água que está acima dos sedimentos, por dessorção dessas partículas químicas, já que a adsorção-dessorção estabelece-se um equilíbrio dinâmico (BAIRD, 2002), sendo que este processo pode ser considerado como o resultado da integração de todos os processos que ocorrem em um ecossistema aquático (ESTEVES, 1988).

A Tabela 10 apresenta a porcentagem granulométrica dos sedimentos coletados no Rio Santa Maria do Leme que foram utilizados para os estudos de recuperação e dos sedimentos coletados nos tanques de piscicultura estudados.

Tabela 10: Porcentagem de granulometria dos sedimentos usados para os ensaios de recuperação e dos sedimentos dos tanques de piscicultura estudados (%).

	Sta M ^a do Leme	Tanque 04	Tanque 05	Tanque 06	Tanque 09	Tanque 15 ¹	Tanque 15 ²
Areia grossa	35,0	40,0	23,5	22,2	23,9	16,3	59,3
Areia média	37,0	35,0	41,5	32,8	34,1	21,7	30,7
Areia fina	7,0	18,2	20,0	16,0	11,0	20,6	zero
Silte	6,0	1,9	4,0	11,0	9,0	6,4	3,0
Argila	0,9	zero	0,8	0,4	2,0	2,9	0,8

1- primeira coleta 2- segunda coleta

Os resultados obtidos de granulometria revelam que os sedimentos dos tanques estudados possuíam característica arenosa, constituídos em sua maior porcentagem de areia. Nenhum dos tanques apresentou sedimentos argilosos, pois as frações silte e argila foram as menores porcentagens encontradas, portanto, a granulometria possivelmente interferiu muito pouco no processo de retenção do hormônio, a não ser no tanque 06 que apresentou cerca de 11% de silte.

A capacidade de adsorção de poluentes nos sedimentos foi controlada pela variação da quantidade de matéria orgânica, pela composição mineralógica e pela variação granulométrica. O principal processo de adsorção atuante foi a ligação química de compostos que tem carga negativa, com a carga positiva da superfície da argila. As frações finas dos sedimentos atuaram como importante indicativo para a avaliação e localização de diversos contaminantes (MOREIRA; BOAVENTURA, 2003).

6.10. Utilização do método proposto para a determinação do hormônio nas amostras dos sedimentos

Do ponto de vista de ciclagem de matéria e fluxo de energia, os sedimentos são um dos compartimentos mais importantes dos ecossistemas

aquáticos. Nos sedimentos ocorrem processos físicos, químicos e biológicos que influenciam todo o metabolismo do ecossistema, além disso os perfis dos sedimentos têm sido utilizados na avaliação e na intensidade dos impactos que os ecossistemas estão submetidos (ESTEVES, 1988).

Os tanques onde foram coletadas as amostras de sedimentos, foram os mesmos onde foram feitas as amostragens de água, entretanto, foram coletadas somente duas amostras, uma na entrada e outra na saída, ao invés de três pontos como na coleta das amostras de água. A coleta em somente dois pontos foi feita pelo fato dos sedimentos não terem muita variabilidade de composição em pontos tão próximos. Para a amostragem da água foram empregados a coleta de três pontos pelo fato de que a água tinha uma taxa de renovação de 10%.

O procedimento de extração do hormônio 17 α -metiltestosterona foi desenvolvido e validado seguindo alguns parâmetros utilizados para o método de extração de pesticidas proposto por Babic, Petrovic e Kastelan-Macan (1998).

De acordo com a equação da reta para o hormônio $Y = 744,65813 + 33,1096 X$, a concentração (X) obtida foi de 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ em 200 μL de solução. Como foi empregada uma massa de 10 g para a extração, a quantidade em massa do hormônio foi a mesma nos 10 g, entretanto, para 1 Kg de sedimentos, a concentração passou a ser 100,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$. Esta foi apenas a demonstração de como foram feitos os cálculos para a quantificação do hormônio nas amostras de sedimentos.

6.10.1. Quantificação do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras dos sedimentos coletados na piscicultura no mês de janeiro

Os resultados referentes à segunda coleta dos sedimentos na piscicultura são apresentados nas Figuras 36-38.

6.10.1.1. Resultado da análise do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras dos sedimentos do tanque 04.

A Figura 36 apresenta o gráfico da concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona presente nas amostras dos sedimentos coletados na entrada e na saída do tanque 04.

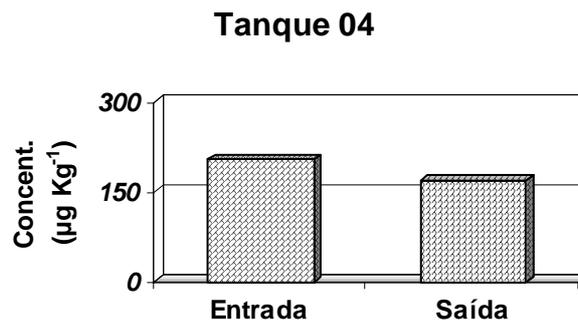


Figura 36: Concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona encontrada nas amostras dos sedimentos do tanque 04.

A concentração de hormônio 17 α -metiltestosterona presente nos sedimentos do tanque 04, foi devido exclusivamente ao hormônio presente na ração, já que este tanque não recebeu efluente, pois não existia interligamento com os outros tanques. Portanto, a ração oferecida aos peixes deve ter sido consumida quase na totalidade, pois houve uma diminuição da concentração do hormônio presente nos sedimentos coletados no ponto de saída do tanque.

6.10.1.2. Resultado da análise do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras dos sedimentos do tanque 05.

A Figura 37 apresenta o gráfico da concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona presente nas amostras dos sedimentos coletados na entrada e na saída do tanque 05.

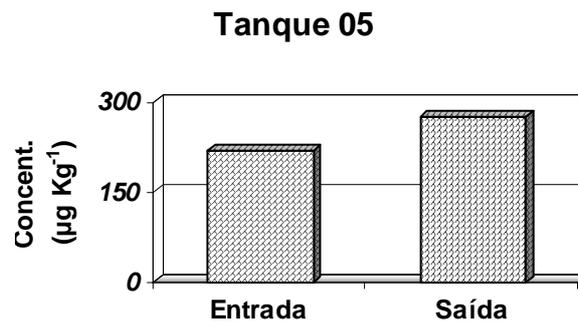


Figura 37: Concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona encontrada nas amostras dos sedimentos do tanque 05.

A concentração do hormônio nos sedimentos do tanque 05, no ponto de coleta de entrada da água foi menor do que no ponto de saída do mesmo, isso provavelmente, foi devido ao fato de que este tanque recebeu o efluente do tanque 04 e também recebeu a ração com o hormônio para a alimentação dos alevinos. A ração provavelmente deve ter sido oferecida numa quantidade excessiva e não deve ter sido totalmente consumida. Os restos da ração contendo o hormônio foram depositados na parte mais baixa do tanque, no ponto de saída, e isso podia ter feito com que a concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona aumentasse nesse ponto de amostragem.

6.10.1.3. Resultado da análise do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras dos sedimentos do tanque 15.

A Figura 38 apresenta o gráfico da concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona presente nas amostras dos sedimentos coletados na entrada e na saída do tanque 15.

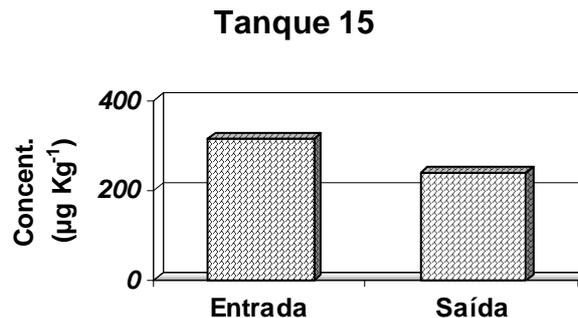


Figura 38: Concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona encontrada nas amostras dos sedimentos do tanque 15.

O tanque 15 não é utilizado para a reversão sexual dos peixes e sim para a engorda dos mesmos. Este recebeu os efluentes dos tanques 04 e 05, e provavelmente a presença do hormônio nas amostras dos sedimentos deste tanque foi decorrente dos efluentes dos dois tanques. Vale lembrar que este tanque recebia a água de todos os tanques da piscicultura, não somente dos tanques onde foram coletadas as amostras de água e dos sedimentos.

A Tabela 11 apresenta os resultados da concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras de sedimentos dos três tanques amostrados na coleta feita no mês de janeiro.

Tabela 11: Resultados da concentração do hormônio nas amostras de sedimentos dos três tanques amostrados na coleta feita no mês de janeiro.

Tanques coletados	Concentração do hormônio $\mu\text{g L}^{-1}$	
	Entrada	Saída
Tanque 04	203,5	168,0
Tanque 05	218,5	273,0
Tanque 15	313,0	237,5

6.10.2. Quantificação do hormônio 17α -metiltestosterona nas amostras dos sedimentos coletados na piscicultura no mês de abril

Os resultados referentes à segunda coleta dos sedimentos na piscicultura são apresentados nas Figuras 39-41.

6.10.2.1. Resultado da análise do hormônio 17α -metiltestosterona nas amostras de sedimentos do tanque 06.

A Figura 39 apresenta o gráfico da concentração do hormônio 17α -metiltestosterona presente nas amostras dos sedimentos coletados na entrada e na saída do tanque 06.

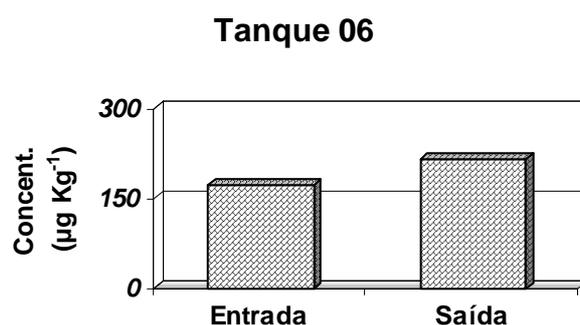


Figura 39: Concentração do hormônio 17α -metiltestosterona encontrada nas amostras dos sedimentos do tanque 06.

A diferença na concentração do hormônio 17α -metiltestosterona no ponto de coleta da entrada da água do tanque 06 foi menor do que no ponto de saída, isto deve-se provavelmente ao fato de que as partículas da ração não consumida

terem se depositado mais neste ponto amostrado, pois a estrutura física do tanque pode ter contribuído para o acúmulo da ração não consumida na saída do tanque. Ressalta-se ainda que a ração contendo o do hormônio foi aplicado por vários dias, com isso houve o acúmulo do hormônio no ponto de saída.

6.10.2.2. Resultado da análise do hormônio 17α -metiltestosterona nas amostras de sedimentos do tanque 09.

A Figura 40 apresenta o gráfico da concentração do hormônio 17α -metiltestosterona presente nas amostras dos sedimentos coletados na entrada e na saída do tanque 09.

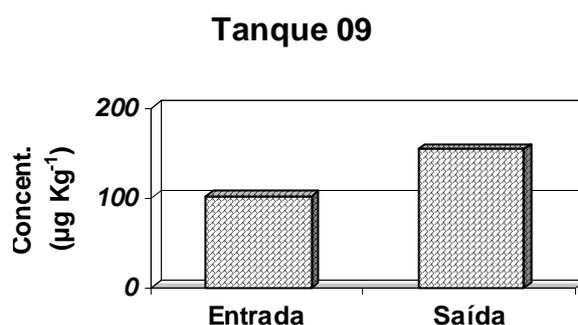


Figura 40: Concentração do hormônio 17α -metiltestosterona encontrada nas amostras dos sedimentos do tanque 09.

No momento da coleta já havia terminado o processo de reversão sexual dos peixes do tanque 09 e, mesmo assim, foi encontrado o hormônio 17α -metiltestosterona nas amostras dos sedimentos.

A presença do hormônio nas amostras coletadas neste tanque é proveniente da ração não consumida durante o processo de reversão sexual que foi sedimentada.

Só foi possível quantificar o hormônio 17α -metiltestosterona presente nas amostras dos sedimentos deste tanque por meio da adição de padrão, isso

porque a sua concentração provavelmente ficou abaixo do limite de quantificação do equipamento.

6.10.2.3. Resultado da análise do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras de sedimentos do tanque 15.

A Figura 41 apresenta o gráfico da concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona presente nas amostras dos sedimentos coletados na entrada e na saída do tanque 15.

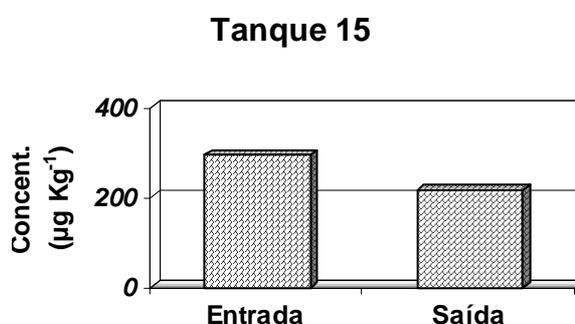


Figura 41: Concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona encontrada nas amostras dos sedimentos do tanque 15.

Este tanque recebia a água de todos os tanques existentes na piscicultura, mas no momento da coleta das amostras de água e dos sedimentos, já havia finalizado o processo reversão sexual dos peixes em quase todos os tanques, menos no tanque 06. Então a concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona encontrada neste tanque provavelmente foi devido aos efluentes provenientes de todos os outros tanques.

A Tabela 12 apresenta os resultados da concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona encontrado nas amostras de sedimentos dos três tanques amostrados na coleta feita no mês de abril.

Tabela 12: Resultados da concentração do hormônio encontrado nas amostras de sedimentos dos três tanques amostrados na coleta feita no mês de abril.

Tanques coletados	Concentração do hormônio $\mu\text{g L}^{-1}$	
	Entrada	Saída
Tanque 06	172,0	215,5
Tanque 09	101,5	153,0
Tanque 15	293,0	216,0

6.11. Comentários sobre a presença do hormônio 17α -metiltestosterona nas amostras de sedimentos da piscicultura

A concentração do hormônio 17α -metiltestosterona encontrada nas amostras dos sedimentos dos tanques nas duas coletas evidenciaram que o hormônio não se degradou muito rapidamente. A ração oferecida aos peixes e não consumida se depositou nos sedimentos.

Muitas vezes foi oferecida a ração aos peixes em excesso, e essa quantidade que o peixe não consumiu, acabou se depositando no fundo dos tanques, causando também a eutrofização dos mesmos. Mesmo no caso desta piscicultura, onde se teve um ambiente lótico, o fluxo da água não conseguiu arrastar toda a ração que fica sem ser consumida.

A Figura 42 apresenta o cromatograma do hormônio presente nas amostras dos sedimentos da piscicultura estudada.

Observa-se pelo pico referente ao hormônio, que o tempo de retenção do 17α -metiltestosterona foi aproximadamente de 15 minutos.

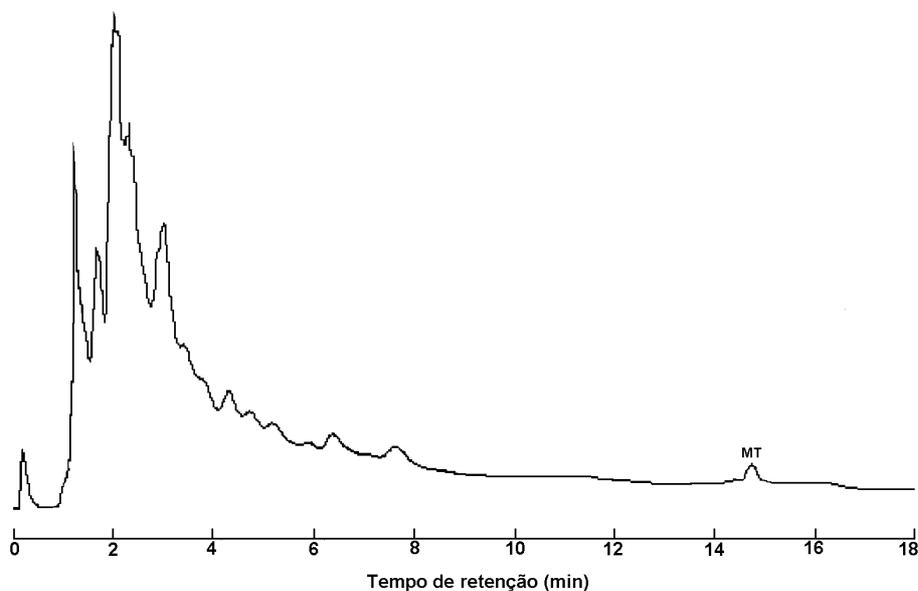


Figura 42: Cromatograma do hormônio presente nas amostras dos sedimentos do tanque 04, da coleta feita no mês de janeiro. Nesse caso foi feita a adição de padrão.

Conforme citado na literatura Marwah, Marwah e Lardy (2005), o hormônio pode degradar-se, portanto fez-se um teste de degradação para verificar a sua persistência.

6.12. Teste de degradação do hormônio 17α -metiltestosterona

A Figura 43 apresenta o cromatograma do padrão do hormônio na concentração de 10 mg L^{-1} . A solução do hormônio padrão que foi preparada no momento da análise cromatográfica (1) e outra solução do hormônio padrão na concentração de 10 mg L^{-1} que foi exposta à luz e às variações de temperatura ambiente por um período de seis meses (2).

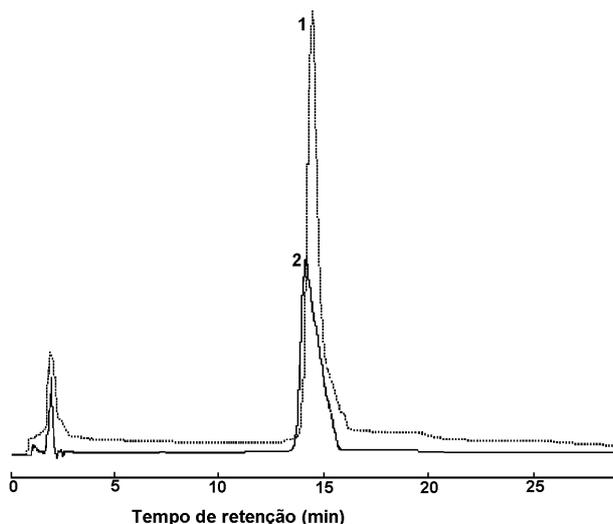


Figura 43: Cromatograma do padrão do hormônio na concentração de 10 mg L^{-1} preparada na hora da injeção (1) e padrão do hormônio na concentração de 10 mg L^{-1} degradada (2).

Como pode-se observar, a concentração do hormônio que ficou em repouso no laboratório, diminuiu pela metade após seis meses. O frasco transparente contendo a solução do hormônio na concentração de 10 mg L^{-1} foi lacrado para evitar que o solvente etanol/água (10:90 v/v) evaporasse.

Esperava-se que após seis meses, o 17α -metiltestosterona tivesse sido todo degradado. Se o frasco que estava a solução do hormônio estivesse sob altas temperaturas e sol direto, essa concentração poderia ter sido reduzida mais do que foi verificado, como observado nos estudos de Marwah, Marwah e Lardy (2005), que verificaram a influência da temperatura e do pH na degradação do hormônio 17α -metiltestosterona.

O estudo feito por Marwah, Marwah e Lardy (2005), mostrou que no pH neutro, foi recuperado 98% do hormônio presente na ração de peixes, ou seja, o composto não degradou nesta condição. Em pH ácido, o produto de degradação majoritário foi o 17-dehidro-testosterona. Em pH básico, o principal produto de degradação foi um composto muito polar oxigenado, muito provavelmente um 7-ceto-testosterona.

Se não ocorrer a degradação ou metabolização do hormônio no tanque, a sua concentração pode diminuir por meio de um processo chamado aromatase. A aromatase é responsável pela biossíntese de andrógenos em estrógenos (BORGES et al., 2005), que é o caso do 17α -metiltestosterona que é aromatisado no potente estrógeno 17α -metilestradiol (PARROTT; WOOD, 2002; PAWLOWSKI et al. 2004).

6.13. Efeito do hormônio 17α -metiltestosterona no ambiente

Se uma quantidade relativamente grande do hormônio 17α -metiltestosterona vai para o meio ambiente, e como este pode ser transformado em estrógeno, a probabilidade dos efeitos maléficos nos organismos aquáticos é muito grande.

A administração do hormônio empregando doses elevadas, com concentrações acima de 100 mg kg^{-1} de ração, pode ocorrer a aromatisação, resultando em indivíduos geneticamente machos e fenotipicamente fêmeas, ou até hermafroditas. Tempos de exposição superiores há 40 dias, resulta em alterações histológicas na organização estrutural das gônadas (ovários e testículos) de alguns indivíduos. Dentre os hormônios utilizados para reversão sexual, o 17α -metiltestosterona é o mais aromatisável que se conhece (CARVALHO; FORESTI, 1996), principalmente em altas doses (WASSERMANN; AFONSO, 2003), entretanto é o hormônio 17α -metiltestosterona mais usado neste processo de reversão sexual.

Como foi encontrada uma concentração relativamente alta do 17α -metiltestosterona em alguns tanques da piscicultura estudada, tem-se a preocupação em termos de uso excessivo deste composto em relação aos peixes

e também ao meio ambiente. Como foi verificado por Devlin e Nagahama (2002), o uso excessivos de andrógenos, reduz a masculinização dos peixes, e em muitos casos favorece a feminilização, pelo processo da aromatase.

Dentre os hormônios, os estrógenos são os que despertam uma maior atenção, por serem compostos extremamente ativos biologicamente. São responsáveis pela maioria dos efeitos disruptores desencadeados pela disposição no ambiente, pois tem uma conformação bem reconhecida pelos receptores (REIS FILHO; ARAÚJO, VIEIRA, 2006). As preocupações em torno dos estrogênos artificiais são tão grandes que em 1999 a *Environmental Protection Agency/EPA* iniciou um programa para catalogar e testar o potencial de impacto dos estrógenos sobre o sistema endócrino.

O organismo dos animais está subordinado a uma série de eventos complexos e integrados, dos quais a liberação de hormônios é vital. Quando a liberação ou a quantidade de hormônios é desequilibrada, os resultados podem ser devastadores e definitivos, como ocorreu com DES (dietilestilbestrol) que ocasionou câncer de útero e vagina nas meninas cujas mães haviam tomado este hormônio na gravidez (COLBORN; DUMANOSKI; MYERS, 1997).

Park (2005) relata em seu estudo na Korea, que o hormônio 17α -metiltestosterona é considerado um disruptor endócrino. Entretanto, no Brasil, não existe legislação vigente e os resíduos dos hormônios utilizados na reversão sexual dos peixes são descartados sem tratamentos nos rios.

Os efeitos ambientais causados pelo hormônio 17α -metiltestosterona ainda são pouco conhecidos. Existem estudos que indicam que os níveis de 17α -metiltestosterona necessários à diferenciação sexual de peixes não oferece perigo à saúde humana, entretanto, seu uso não é aprovado pelo FDA (Food and

Drug Administration) nos EUA (GREEN; TEICHERT-CODDINGTON, 2000). Mas o FDA autorizou a venda controlada da ração com o hormônio 17 α -metiltestosterona através do INAD (Investigational New Animal) (TEICHERT-CODDINGTON; MANNING; EYA, 2000).

Talvez não se saiba a dimensão do “estrago” que os efluentes dos estabelecimentos onde é utilizado o processo de reversão sexual podem causar futuramente.

Apesar de ter sido demonstrado em estudos específicos que a utilização do hormônio não resulta no acúmulo de resíduos nos tecidos dos peixes tratados, ainda existe a preocupação quanto à sua liberação no ambiente (CURTIS et al., 1991; ROTHBARD et al., 1990; BEARDMORE; MAIR; LEWIS, 2001).

Neste estudo foi encontrado o hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras de água e de sedimentos da piscicultura estudada. Isso pode ser um problema, pois a população ribeirinha estará ingerindo a água que sai das pisciculturas, sem tratamento prévio. Uma alternativa eficiente na reversão sexual, é o uso de altas temperatura na água, antes da diferenciação sexual das gônadas, que consegue-se reverter sexualmente, sem a adição de compostos ativos. Estudos recentes sobre a tilápia-do-Nilo demonstraram que altas temperaturas provocam efeitos semelhantes aos proporcionados pela utilização de hormônios esteróides na reversão sexual, dependendo da termossensibilidade das linhagens e das famílias dos peixes estudados (BORGES et al., 2005).

Outro fato em relação ao procedimento de reversão sexual que deve ser mencionado é a criação de alevinos em tanques-rede, que permite a utilização de corpos d'água para a produção intensiva sem a necessidade do preparo convencional do local (GRAEFF; AMARAL JUNIOR, 2004). Esse sistema é

promissor para as regiões que possuem grande números de açudes de dimensões muito grandes e difíceis manejos para a criação tradicional. Entretanto, a água utilizada neste procedimento não recebe tratamento, muitas vezes sendo captada diretamente nos locais da reversão, e também pela estação de tratamento para abastecimento público. Deve-se levar em consideração que as populações ribeirinhas utilizam esta água sem tratamento algum.

Como 17α -metiltestosterona é um poluente emergente, e se empregado nos tanques em grandes quantidades, pode causar efeito sinérgico, e pouco se sabe a seu respeito. Seria importante empregar um tratamento adequado dos efluentes de piscicultura antes do descarte nos rios.

Juntamente com a preocupação ambiental, deveria incorporar as ações de pesquisa e desenvolvimento, pois este estudo é uma alternativa que deve ser levada em consideração, pois há uma demanda crescente da sociedade brasileira pela preservação das áreas de risco de degradação e pelo uso conservacionista dos recursos naturais voltados à produção agropecuária, principalmente no que diz respeito à quantidade e qualidade dos recursos hídricos.

Este trabalho serviu para se ter os parâmetros orientadores aos produtores, pois eles podem optar por tratamentos dos efluentes de seus estabelecimentos, e não fazer o descarte diretamente nos corpos d'água.

Deve-se gerar informações e resultados científicos sobre impactos no meio ambiente e na saúde humana, causados pelo hormônio 17α -metiltestosterona usado na reversão sexual de peixes, para que orientem a tomada de decisões por parte de toda a comunidade e governantes. Enquanto esses resultados não forem gerados, deve-se adotar o "princípio da precaução", de modo que a biossegurança esteja garantida.

Outro ponto pouco explorado refere-se à avaliação de impactos no meio ambiente através de dados ecotoxicológicos, sendo necessário uma avaliação criteriosa deste composto no meio ambiente e uma vez conhecidos esses efeitos, será necessário estabelecer limites de concentração para o seu descarte em corpos receptores.

6.14. Testes de ecotoxicidade

Os testes de ecotoxicidade foram feitos nos meses de maio de 2006 a outubro de 2006.

Por meio dos testes estatísticos *t de Student*, com ($\alpha= 0,01$) aplicados para *Daphnia similis*, pode-se verificar que não ocorreu diferença significativa entre o branco e o branco com etanol, portanto, foi feito a interpolação dos dados em um único grupo.

Primeiramente, foi feito o teste CHI-Quadrado para a verificação da normalidade dos dados e verificou-se que os dados apresentaram distribuição normal.

A análise dos dados de fertilidade foi feita através de testes estatísticos Tukey para dados paramétricos, através do software TOTXSTAT 3.3 computer Program (GULLEY; BOELTER; BERGMAN, 1991).

De acordo com a análise estatística feita pode-se dizer que nas concentrações do hormônio utilizadas neste estudo não apresentaram toxicidade para a *Daphnia similis*.

A análise estatística dos resultados não mostrou diferenças significativas nas taxas de reprodução e sobrevivência dos organismos-teste expostos aos hormônios, quando comparados com o controle.

A Tabela 13 apresenta o teste de ecotoxicidade crônica de *Daphnia similis* em diferentes concentrações do hormônio nas quais os organismos-teste foram expostos e não apresentaram toxicidade.

Tabela 13: Teste de toxicidade crônica de *Daphnia similis* em diferentes concentrações do hormônio nas quais os organismos-teste foram expostos.

GRUPO	IDENTIFICAÇÃO	MÉDIA DE TRANSFORMAÇÃO	MÉDIA ORIGINAL	GRUPOS		
				3	1	2
3	50 $\mu\text{g L}^{-1}$	22.900	22.900	/		
1	1 & 2 interpolados	23.150	23.150	.	/	
2	1 $\mu\text{g L}^{-1}$	23.700	23.700	.	.	/

. = não existe diferença significativa.

Valor de Tukey (3,37) = 3,49.

Neste experimento verificou-se que o teste apresentou resultado válido, pois de acordo com a ABNT (2005), este experimento teria que terminar com 80% das fêmeas adultas sobreviventes no controle, onde tivessem produzido no mínimo 15 organismos jovens. Os resultados apresentaram 80% de sobrevivência das fêmeas adultas e uma média de 18 neonatos por fêmea no controle.

A Tabela 14 apresenta as porcentagens de sobrevivência e números de neonatos obtidos no teste de toxicidade crônica com *Daphnia similis* nas soluções-teste e nos controles, durante os 12 dias do experimento, verificando que não houve diferença estatística das concentrações do hormônio em relação ao controle. Na tabela 14 também são apresentadas as variáveis físicas e químicas iniciais e finais dos testes de toxicidade.

Tabela 14: Porcentagens de sobrevivência e números de neonatos obtidos no teste de toxicidade crônica com *Daphnia similis* nas soluções-teste e nos controles, e as variáveis físicas e químicas.

Concentração	Nº de organismos		Sobrevivência	Nº de neonatos	pH		OD (mg L ⁻¹)		Dureza (mg CaCO ₃) L ⁻¹		Condutividade (µS cm ⁻¹)		DE
	I	F	(%)	(Total)	I	F	I	F	I	F	I	F	
controle	10	8	80	184	7,40	7,56	8,4	7,8	46	44	157,3	164,3	-
etanol	10	9	90	261	7,43	7,78	7,5	7,9	42	46	156,1	164,0	não
1 µg L ⁻¹	10	8	80	237	7,46	7,52	8,0	8,1	46	48	153,7	164,1	não
50 µg L ⁻¹	10	6	60	229	7,47	7,45	7,8	8,3	46	48	153,3	163,2	não

I- inicial F- final DE- Diferença estatística: Teste TuKey

Pode-se observar que as variáveis físicas e químicas ficaram dentro dos parâmetros estabelecidos pela ABNT (2005), com algumas alterações nos valores das condutividades, sendo que estes valores só se apresentaram alterados na solução de descarte. Isso se justifica pelo fato de acúmulo de materiais orgânicos, como restos de alimento, troca de carapaça, dentre outros. Não apresentando indícios de que isso influenciou nos resultados.

A mais alta mortalidade da *Daphnia similis* foi verificada quando empregou a maior concentração do hormônio (50 µg L⁻¹), entretanto, essa concentração não foi suficiente para causar efeito crônico aos organismos-teste.

O pH de todas as soluções-teste para a *Daphnia similis* foram medidas e ficaram entre 7,29-7,50 para as concentrações recém-preparadas e entre 7,36-7,71 para as concentrações a serem descartadas, sendo portanto, valores neutros e não influenciando na qualidade do teste. A acidificação pode afetar os organismos aquáticos diretamente através da toxicidade do íon hidrogênio e indiretamente através da quebra da dinâmica alimentar e alteração das condições bióticas (WEBSTER et al., 1992).

As primeiras crias foram separadas para verificar se ocorreria a reversão sexual com o hormônio 17α-metiltestosterona nesta espécie, os neonatos foram

transferidos todos juntos para um frasco plástico de um litro e os neonatos morreram, provavelmente devido a efeitos relacionados à superpopulação. O teste continuou até a terceira geração, verificando somente o número de neonatos e a mortalidade dos organismos adultos, descartando, portanto, todos os neonatos que eram contados. Também não pode ser verificado se ocorreu a reversão sexual, devido a mortalidade dos neonatos.

Pelo teste crônico verificou-se que não houve diferença significativa na taxa de sobrevivência dos organismos-teste em relação ao controle e nem na taxa de reprodução, concluindo que nessas concentrações estudadas não se verifica toxicidade do hormônio aos cladóceros da espécie *Daphnia similis*. E tentando reproduzir os resultados, porém em um menor tempo de exposição, os mesmos testes foram feitos para a espécie *Ceriodaphnia silvestrii*, por apresentarem ciclo de vida mais curto e portanto, apresentando os resultados com a mesma eficiência da *Daphnia similis*.

Depois de montados os testes crônicos, os parâmetros físicos e químicos foram monitorados e anotados. O número de neonatos total e a porcentagem de sobrevivência também são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Porcentagens de sobrevivência e números de neonatos obtidos no teste de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia silvestrii* nas soluções-teste e nos controles, e as variáveis físicas e químicas.

Concent	Nº de organismos		Sobrevivência (%)	Nº de neonato (Total)	pH		OD (mg L ⁻¹)		Dureza (mg CaCO ₃ L ⁻¹)		Condutividade (µS cm ⁻¹)	
	I	F			I	F	I	F	I	F	I	F
controle	10	8	80	65	7,34	7,73	7,8	7,7	40	50	153,7	180,7
etanol	10	8	80	46	7,42	7,71	7,3	7,5	44	50	144,2	172,2
1 µg L ⁻¹	10	8	80	48	7,46	7,70	8,0	8,1	44	50	145,4	185,9
50 µg L ⁻¹	10	7	70	41	7,79	7,65	7,1	7,6	42	50	158,4	167,2

I- inicial F- final

Neste experimento não pode ser validado, pois de acordo com ABNT (2005), os ensaios devem ser validados quando a mortalidade dos organismos

adultos não exceder 20% e o número médio de organismos jovens produzidos por fêmeas no controle for igual ou maior que 15.

O teste com a *Ceriodaphnia silvestrii* finalizou no 10^o dia. O número de organismos jovens não ultrapassou a média de 6,5 no controle, não podendo ser validados, e números bem mais reduzidos nas outras concentrações, mas os neonatos foram registrados e transferidos, sendo um organismo para cada recipiente de 15 mL em água reconstituída com alimento. Todos os organismos de três crias foram transferidos, seguindo as normas da ABNT (2005), sendo guardados os neonatos da primeira, terceira e quarta cria, os neonatos da segunda cria foram descartados, porém contados antes do descarte.

A variabilidade dos resultados obtidos em testes de toxicidade depende do estado fisiológico, ou seja, da saúde dos organismos submetidos aos testes. Além dos problemas relacionados ao organismo-teste, outros fatores podem ser atribuídos, como as condições do próprio ambiente. Do ponto de vista da variabilidade ambiental, a obtenção de neonatos em quantidade e qualidade necessárias para os testes depende da padronização e do controle das condições de cultivo (qualidade da água, quantidade e qualidade do alimento fornecido e temperatura). Neste caso, os neonatos não apresentavam bom estado fisiológico, o que deixou a comprometer os resultados, mas mesmo assim foram verificados quanto à taxa de reversão sexual que poderia ocorrer, sem, entretanto, fazer a validação dos resultados com tratamentos estatísticos.

Os parâmetros físicos e químicos foram medidos e esperou-se até que os organismos jovens tivessem a primeira cria, sendo neste momento descartados, pois quando isso acontecia, tinha-se a certeza de que não ocorreu a reversão sexual nos mesmos. Os organismos que não tiveram cria, foram guardados em

formol 10% e posteriormente foram analisados em microscópio para a determinação do sexo, sendo tratados na Tabela 16 como *sexo indefinido*.

A Tabela 16 apresenta o número total de neonatos das quatro crias, o número de neonatos descartados da segunda cria, o número de neonatos que foram criados e avaliados quanto à reversão sexual.

Tabela 16: Neonatos da primeira, terceira e quarta cria de *Ceriodaphnia silvestrii* que foram criados e avaliados quanto a sexualidade.

Concentração	Nº de neonatos (Total)	2ª cria, descartada (Número)	Neonatos criados (Número)	Fêmeas adultas (Número)	Neonatos imóveis (Número)	Sexo Indefinido (Número)
controle	65	22	43	34	06	03
etanol	46	15	31	23	03	05
1 µg L ⁻¹	48	08	40	29	05	06
50 µg L ⁻¹	41	13	28	22	02	04

Percebeu-se que não houve diferença significativa no número de neonatos, evidenciando que as concentrações utilizadas nos testes laboratoriais indicam ausência de toxicidade aos organismos-teste.

Dos organismos considerados de sexo indefinido, todos foram analisados no microscópio. A Tabela 17 apresenta o número de neonatos de sexo indefinido e o número de fêmeas encontradas nessa parte do ensaio.

Tabela 17: Neonatos de sexo indefinido que não tiveram cria em diferentes concentrações do hormônio 17α-metiltestosterona, e número de fêmeas.

Concentração	Sexo Indefinido (Número)	Fêmeas adultas (Número)
controle	03*	01
etanol	05	05
1 µg L ⁻¹	06	06
50 µg L ⁻¹	04**	03

* 02 efípias

** 01 organismo perdido durante o teste.

Neste estudo com o 17 α -metiltestosterona observou-se dois efípios no controle, sendo portanto, causado por algum fator externo, como mudança de temperatura, diferentes manipuladores, dentre outros, fez com que ocorresse o aparecimento de machos na cultura. Em cladóceros, os ovos partenogenéticos amadurecem no interior das fêmeas por diversas gerações até que certos fatores, por exemplo, alterações ambientais e superpopulação induzem o aparecimento de machos e ocorre, então, a fecundação dos ovos. Os ovos fecundados são grandes e apenas dois são produzidos em um único grupo, um de cada ovário. As paredes da câmara incubadora transformam-se agora em um cápsula protetora em forma de sela, o efípio (BARNES, 1984). Na maior concentração do hormônio 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ foi perdido um organismo, e os outros três que foram avaliados não apresentaram reversão sexual, sendo portanto fêmeas.

Como pode-se observar não ocorreu mudança de sexo dos organismos-teste nas soluções com o hormônio 17 α -metiltestosterona. Este resultado está de acordo com trabalhos anteriores que indicam que este hormônio só tem atividade em algumas espécies (PANDIAN; SHEELA, 1995; DEVLIN; NAGAHAMA, 2002).

Kashian, Dodson (2004), verificou em seu estudo que os hormônios andrógenos e estrógenos, dentre eles, a testosterona, afetou a fecundidade, a reprodutividade e o desenvolvimento da *Daphnia magna*, entretanto, não interferiu no controle da diferenciação sexual.

LeBlanc, Mu e Rider (2000) fizeram testes crônicos com o organismo *Daphnia magna* e observaram em seus estudos que o andrógeno testosterona ocasionou anormalidades como antenas assimétricas ou não desenvolvimento de uma das antenas, formas irregulares, como carapaças deformadas e *daphnias* sem forma. O que possivelmente pode ser observado em estudos mais

específicos com o hormônio 17 α -metiltestosterona, uma vez que este hormônio é um derivado sintético da testosterona.

Oda et al. (2005) estudou a produção de neonatos machos em quatro espécies de Cladóceros, expostas a hormônios como o etil2-(4-fenoxifenoxi)etilcarmato, solubilizado em etanol na razão de 10 a 100 mg L⁻¹, com concentração de solvente menores que 0,1% v/v, e verificou que esse hormônio produziu neonatos machos nas quatro espécies de Cladóceros, dentre elas a *Ceriodaphnia dubia*.

Em relação ao solvente utilizado para solubilização do hormônio, Zhang e Baer (2000) observaram que o etanol não afetou a produção de machos. Entretanto, o etanol pode ter influenciado no aparecimento dos efípios.

Em paralelo, para avaliar se ocorreu toxicidade do etanol, foi realizado um teste com a mesma espécie, a *Ceriodaphnia silvestrii*, utilizando diferentes concentrações de etanol (12,5; 25,0 e 62,5 μ L) para cada litro de solução de água reconstituída, foi também feito o branco de água reconstituída para a comparação, e o teste foi finalizado no 8º dia.

A Tabela 18 apresenta as porcentagens de sobrevivência de organismos adultos e o número de organismos que não tiveram cria obtidos no teste de toxicidade com *Ceriodaphnia silvestrii* nas soluções-teste com etanol e no controle, e as variáveis físicas e químicas, medidas no início e no fim do teste.

Tabela 18: Teste de toxicidade crônica para avaliar a sobrevivência e reprodução da *Ceriodaphnia silvestrii* em diferentes concentrações de etanol nas soluções-teste e no controle, e as variáveis físicas e químicas.

Concent.	Nº de organismos		*	pH		OD (mg L ⁻¹)		Dureza (mg CaCO ₃ L ⁻¹)		Condutividade (µS cm ⁻¹)	
	I	F		(Nº)	I	F	I	F	I	F	I
controle	10	10	02	7,58	7,67	7,5	7,3	42	48	149,5	165,5
12,5 µL L ⁻¹	10	10	02	7,60	7,65	7,8	7,0	44	48	150,8	161,5
25 µL L ⁻¹	10	09	03	7,59	7,59	7,7	7,8	44	48	150,9	162,6
62,5 µL L ⁻¹	10	10	03	7,60	7,68	7,6	7,6	46	48	148,2	187,7

I- inicial F- final * Número de organismos que não tiveram cria

Como pode-se observar a quantidade de solvente não influenciou no resultado dos testes de toxicidade, pois o número de organismos que não tiveram cria foi o mesmo do controle, o qual não continha etanol. Neste teste foi verificado somente o número de fêmeas que tiveram cria, mas o número de neonatos não foi contado. Pode-se inferir que o etanol não afetou a saúde dos organismos neste experimento. Segundo USEPA¹ (1975 apud Barbosa et al., 2003), em testes curtos, a quantidade de solvente não pode ultrapassar 500 µL L⁻¹ e a OECD² (1998 apud Barbosa et al., 2003) recomenda que para testes longos não se devem ultrapassar 100 µL L⁻¹.

Hutchinson et al. (2006) ressalta em seu trabalho de revisão que o solvente é necessário, entretanto, recomenda-se que nos estudos de reprodução de organismos aquáticos, o máximo de concentração de solvente não deve

¹ US Environmental Protection Agency, Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organism (1975). Methods for acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. US Enviro Protection Agency. Ecol Res Ser. EPA-660/3-75-009, National Water Quality Laboratory, Duluth, MN.

BARBOSA, I. R. et al. (2003) Acute and Chronic Toxicity of Dimethylsulfoxide to *Daphnia magna*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.70, n.6, p.1264-1268. June.

² OECD (1998) Guidelines for testing of chemicals. Guidelines 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998. Organization for Economic Cooperation and Development. Paris, France.

BARBOSA, I. R. et al. (2003) Acute and Chronic Toxicity of Dimethylsulfoxide to *Daphnia magna*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.70, n.6, p.1264-1268. June.

exceder $20 \mu\text{L L}^{-1}$ da água de diluição. Mas levando em consideração o citado por este autor, as quantidades utilizadas de etanol por litro de solução no estudo com o hormônio 17α -metiltestosterona, ultrapassaram os valores sugeridos pelo mesmo, o que possivelmente pode ter afetado o número de organismos que não tiveram cria, já que nas quantidades mais elevadas ($25,0$ e $62,5 \mu\text{L L}^{-1}$), o número de organismos que não tiveram cria foram 03.

Zhang e Baer (2000) investigaram os efeitos do fotoperíodo, a disponibilidade de alimento e a presença de solventes na reprodução da *Daphnia magna*. Em fotoperíodos de 16 horas de luz e 8 horas de escuridão, na presença de $0,01 \text{ ml L}^{-1}$ de etanol, foi observado que diminuiu o número de neonatos, com estas mesmas condições e associado com a menor quantidade de alimento, diminuiu o número de fêmeas. Já nas mesmas condições de fotoperíodo, mas com maior quantidade de alimento, o etanol não afetou o número de neonatos, mas diminuiu drasticamente o número de fêmeas.

Já com fotoperíodo, de 8 horas de luz e 16 horas de escuridão, o etanol diminuiu a fecundidade, ou seja, o número de neonatos. Enquanto que, com maior quantidade de alimento e exposto ao etanol, resultou num decréscimo significativo de descendentes das fêmeas.

Segundo Rand e Petrocelli (1985), um agente tóxico ou uma substância tóxica é um agente capaz de produzir um efeito adverso em um sistema biológico podendo causar danos ou morte. No entanto, para que possa ocorrer um efeito tóxico ou adverso em um sistema biológico é necessário que o agente tóxico ou um produto de seu metabolismo encontre sítios específicos, esteja em concentração suficiente e permaneça em contato em tempo suficiente para produzir a manifestação tóxica.

A concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona utilizada nestes experimentos não apresentaram efeitos tóxicos sobre os organismos, não podendo descartar a hipótese, entretanto, de que em concentrações maiores, isso possa vir a ocorrer, visto que os microorganismos filtram a água para retirar oxigênio e alimentos.

Deve-se levar em consideração que foram testadas somente duas espécies que ocupam o mesmo nível trófico. Os Cladóceros são as maiores constituintes da comunidade zooplanctônica.

Possivelmente, o hormônio 17 α -metiltestosterona pode causar um grande impacto se usado em altas concentrações não somente a essa classe, mas também a toda a população e ao ecossistema, e a toxicidade não evidenciada neste estudo quando empregou-se as espécies de Cladóceros, poderá ocorrer em outros organismos, como por exemplo, em espécies de moluscos e peixes presentes em corpos d'água.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho representa uma contribuição aos estudos já desenvolvidos relacionados ao 17 α -metiltestosterona uma vez que, para amostras de água e sedimentos não são encontrados na literatura métodos analíticos para a determinação do hormônio.

A técnica de extração em fase sólida desenvolvida para a extração do hormônio da água dos tanques de piscicultura mostrou-se adequada.

O método para a extração do hormônio das amostras de sedimentos foi feita utilizando-se ultra-som. Desse modo, o procedimento analítico desenvolvido apresentou a vantagem de envolver um processo simples de extração, utilizando pequenas massas e menor volume de solventes, quando comparado com as técnicas convencionais, como a Soxhlet.

Os procedimentos propostos foram avaliados utilizando HPLC-UV quanto à linearidade, sensibilidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. Os métodos de extração do hormônio da água e dos sedimentos se mostraram lineares, sensíveis, seletivos, precisos e exatos nas condições estabelecidas. Os limite de detecção (LDs) e os limites de quantificação (LQs) do HPLC-UV se apresentaram adequados para a análise do hormônio 17 α -metiltestosterona nas amostras de água e sedimentos.

A aplicação do método desenvolvido e validado neste estudo só foi possível pela aplicação da adição de padrão, que possibilitou a identificação e quantificação do hormônio 17α -metiltestosterona em amostras de água e de algumas amostras de sedimentos. Caso não tivesse utilizado esta ferramenta de adição padrão, mesmo após extensiva concentração do hormônio nas matrizes água e sedimentos, as concentrações do hormônio ficariam abaixo dos LDs e LQs da técnica.

Antes da implantação de uma piscicultura deve ser feita uma avaliação de todos os tipos de impactos que essa atividade pode causar. A implantação dos projetos deve ser cautelosa para que não cause danos irreversíveis.

As pisciculturas descartam o hormônio 17α -metiltestosterona nos rios sem nenhum tratamento e os malefícios causados por este composto não podem ser vistos no momento em que ele é descartado, mas sabe-se que o composto continua em atividade por algum tempo, e que futuramente poderá ocasionar problemas ambientais e até mesmo ao ser humano.

A carga de nutrientes aumentou no último tanque da piscicultura estudada, que recebe a água dos demais tanques. Ocorreu um decréscimo na qualidade da água, com redução elevada das concentrações de oxigênio dissolvido, entre outras alterações físicas e químicas, como condutividade, o que pode estar causando sérios problemas de contaminação do Ribeirão dos Machados.

Outro fator relevante é o fato do hormônio 17α -metiltestosterona ser considerado em alguns países como disruptor endócrino para gastrópodes, o que pode futuramente influenciar na saúde dos seres humanos, pois pouco conhecimento se tem sobre o composto.

Os hormônios sintéticos podem exercer efeitos primários e secundários em muitas espécies, sendo que os efeitos primários resultam no impacto ecotoxicológico e os secundários estão relacionados com a mortalidade, efeito letal e efeitos subletais em espécies que não eram alvo do tratamento, pois não houve muitas características relevantes quanto à mortalidade e efeitos crônicos nas *Daphnias* e *Ceriodaphnias*.

LeBlanc, Mu e Rider (2000) observaram que a testosterona ocasionava deformações nas *Daphnias*, o que pode ser outro indício de que os compostos sintéticos influenciam na formação e reprodução desses organismos e de outros.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Considerando este estudo como um dos pioneiros feitos no Brasil, uma vez que até o presente momento, nenhum trabalho realizado foi publicado relatando a problemática do descarte do hormônio 17 α -metiltestosterona em pisciculturas para a técnica da reversão sexual ao meio ambiente, como também apresentando as concentrações obtidas para o mesmo. Vários estudos podem ser feitos como uma continuidade ou mesmo um aprimoramento deste estudo.

Nos tópicos a seguir são apresentadas algumas sugestões para novos trabalhos, envolvendo a problemática no meio ambiente e sua ocorrência em matrizes ambientais.

- Aprimoramento dos procedimentos analíticos empregados neste estudo objetivando alcançar limites de detecção ainda menores, avaliação da cromatografia líquida com outros tipos de detectores e da seletividade destes detectores em relação ao composto estudado. Desenvolvimento de novos métodos de extração do hormônio para a água e sedimentos empregando, por exemplo, SPMD, SPME, extração líquido-líquido ou até mesmo a extração em fase sólida em condições diferentes das empregadas neste estudo para a extração do hormônio das amostras de água. Utilizar outras técnicas de quantificação do hormônio nas amostras de água e de sedimentos, como LC/MS, LC/MS/MS.

- Utilizar a cromatografia gasosa como técnica analítica para determinação do hormônio;
- Desenvolver a metodologia de extração do hormônio 17 α -metiltestosterona em amostras de peixes;
- Determinar a concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona nos rios que recebem os efluentes de piscicultura, neste caso necessitará de uma técnica com limite de detecção muito baixo, pois o hormônio estará muito diluído, dificultando sua pré-concentração;
- Determinar a concentração do hormônio MT em estações de tratamento de esgoto em alguma cidade próxima de pisciculturas. Nesse caso, fazer a determinação do hormônio na entrada da estação de tratamento de esgoto, e depois do tratamento, para verificar se ocorreu a remoção do hormônio e/ou biodegradação;
- Fazer os testes de degradação do hormônio 17 α -metiltestosterona e estudar os possíveis produtos de degradação;
- Fazer testes morfológicos de uma tilápia do Nilo revertida sexualmente com uma que não seja revertida;
- Determinar alguns parâmetros populacionais, como taxa de crescimento, natalidade e mortalidade para espécies freqüentes de Cladóceros existentes no ambiente de efluentes de pisciculturas;
- Fazer testes crônicos com as Cladóceros em meios com hormônio 17 α -metiltestosterona e seus produtos de degradação, para verificar casos de anormalidades ;
- Fazer os testes de ecotoxicidade com outras espécies maiores de organismos;

9. TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS NO DECORRER DO DESENVOLVIMENTO DESTA PESQUISA

A constante preocupação com a contaminação ambiental tem elevado o número de pesquisas que envolvem a utilização de substâncias químicas. Entretanto, as pesquisas geram resíduos que podem ser introduzidos no meio ambiente, caso não tenham o devido tratamento.

A ausência de tratamento e a incorreta disposição dos resíduos químicos gerados após uma pesquisa podem levar à contaminação do solo, do ar e dos recursos hídricos, comprometendo a saúde pública, levando tempo e custo elevados para que o quadro possa ser revertido.

Como este estudo envolveu extração de hormônio de água e de sedimentos, foram utilizados diferentes solventes. Nesses casos, não houve possibilidade de utilizar outra técnica, que utilizasse quantidades menores de solvente. Assim, uma das metas deste estudo foi tratar os resíduos gerados durante a sua execução, onde se guardava e etiquetava todos os solventes em frascos de vidro e posteriormente, eram enviados ao Laboratório de Resíduos Químicos (LRQ) do Campus da Universidade de São Paulo em São Carlos.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2003). Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 4 abr. 2006.

ALDA, M.J.; BARCELÓ, D. (2001a). Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-diode array detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.911, n.2, p.203-210, Mar.

_____. (2001b). Use of solid-phase extraction in various of its modalities for sample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.938, n.1/2, p.145-153, Dec.

AMARANTE JUNIOR, O.P. et al. (2001). Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Caderno de Pesquisas**, São Paulo, v.12, n.1/2, p.116-131.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (1994). **E 1193-1194**. Standard guide for conducting renewal life-cycle toxicity tests with *Daphnia magna*. In: Annual Book of ASTM Standards, Philadelphia. p.510-526.

ARANA, L.V. (2004). **Princípios químicos de qualidade da água em aqüicultura**: uma revisão para peixes e camarões. 2.ed. Florianópolis: UFSC.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (1968). **MB-32**: Análise granulométrica de solos (método brasileiro). Rio de Janeiro.

_____. (2004). **NBR-12713**: Ecotoxicologia aquática - toxicidade aguda - método de ensaio com *Daphnia* spp (crustácea, cladocera). Rio de Janeiro.

_____. (2005). **NBR-13373**: Ecotoxicologia aquática - toxicidade crônica - método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (crustácea, cladocera). Rio de Janeiro.

BABIC, S.; PETROVIC, M.; KASTELAN-MACAN, M. (1998). Ultrasonic solvent extraction of pesticides from soil. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.823, n.1/2, p.3-9, Oct.

BACAN, N. et al. (2001). **Química analítica quantitativa elementar**. 3.ed. São Paulo: Edgard Blucher.

- BAIRD, C. (2002). **Química ambiental**. 2.ed. São Paulo: Bookman.
- BARDACH, J.E.; RYTHER, J.H.; McLARNEY, W.O. (1972). **Aquaculture**: the farming and husbandry of freshwater and marine organisms. New York: Science; John Wiley.
- BARNES, R.D. (1984). **Zoologia de invertebrados**. 4.ed. São Paulo: ROCA.
- BEARDMORE, J.A.; MAIR, G.C.; LEWIS, R.I. (2001). Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. **Aquaculture**, Amsterdam, v.197, n.1/4, p.283-301, June.
- BILA, D.M.; DEZOTTI, M. (2003). Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, São Paulo, v.26, n.4, p.523-530, jul./ago.
- BOMBARDELLI, R.A. et al. (2004). Masculinização de larvas de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por banhos de imersão e o andrógeno dissolvido em solução de dimetilsulfóxido (DMSO). **Acta Scientiarum: animal sciences**, Maringá, v.26, n.2, p.209-215.
- BORGES, A.M. et al. (2005). Produção de populações monossexo macho de tilápia-do-nilo da linhagem Chitralada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.40, n.2, p.153-159.
- BOSCOLO, W.R. et al. (2001). Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia=Brazilian Journal of Animal Science**, Viçosa, v.30, n.5, p.1391-1396, set./out.
- BOYD, C.E. (1990). **Water quality in ponds for aquaculture**. Alabama: Birmingham.
- BOYD, C.E.; QUEIROZ, J. (1997). Aquaculture pond effluent management. **Aquaculture Asia**, Bangkok, v.2, n.2, p.43-46, Apr./June.
- BRASIL. Ministério da Saúde. (2004). **Portaria nº 518, de 25 de março de 2004**. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências. Disponível em <<http://www.uniagua.org.br/images/destaque/portaria518.pdf>>. Acesso em: 30 ago.2006.
- BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, E.L.G.; ELER, M.N. (2006). Caracterização geral da bacia hidrográfica do Rio Mogi-Guaçu. In: ELER, M.N.; ESPÍNDOLA, E.L.G. **Avaliação dos impactos dos pesque-pague**: uma análise da atividade na bacia hidrográfica do rio Mogi-Guaçu. São Carlos: RiMa. p.21-27.

BRITO, N.M. et al. (2002). Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação. **Pesticidas: revista ecotoxicologia e meio ambiente**, Curitiba, v.12, p.155-168, jan./dez.

_____. (2003). Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: revista ecotoxicologia e meio ambiente**, Curitiba, v.13, p.129-146, jan./dez.

BUDWORTH, P.R.; SENGER, P.L. (1993). Fish-to-fish testosterone transfer in a recirculating-water system. **Progressive Fish Culturist**, Bethesda, v.55, n.4, p.250-254.

CARVALHO, E.D.; FORESTI, F. (1996). Reversão de sexo em tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* TREWAVAS, 1983, induzida por 17-alfa-metiltestosterona: proporção de sexo e histologia das gônadas. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v.56, n.2, p.249-262, maio.

CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. (2001). **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: EduFSCar. (Série Apontamentos). Apostila.

CASTAGNOLLI, N.; CYRINO, J.E. (1986). **Piscicultura nos trópicos**. São Paulo: Manole.

CHASIN, A.A.M. et al. (1998). Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**, São Paulo, v.11, n.1, p.1-6.

CHUI, Q.S.H.; ZUCCHINI, R.R.; LICHTIG, J. (2001). Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama. **Química Nova**, São Paulo, v.24, n.3, p.374-380, maio/jun.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. (2000). **Análise instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência.

CIOLA, R. (1998). **Fundamentos de cromatografia a liquido de alto desempenho**. São Paulo: Edgard Blucher.

COELHO, S.R. (1997). Situação atual e perspectivas da indústria de rações para organismos aquáticos. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 1997, Piracicaba. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal. p.102-116.

COLBORN, T.; DUMANOSKI, D.; MYERS, J.P. (1997). **O Futuro roubado**. Porto Alegre: L&PM.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (1990). **Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. São Paulo: CETESB. (Série Manuais, 6).

_____. (1992). **Água** - métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos. São Paulo: CETESB. (Série Didática, 1).

_____. (1999). **Comitê da bacia do Mogi-Guaçu**. Pirassunung: CETESB. (Relatório).

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (2005). **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005** – dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamentos de efluentes, e dá outras providências. Brasília. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res//res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 30 ago. 2006.

CURRIE, L.A. (1999). Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC recommendations 1995). **Analytical Chimica Acta**, Amsterdam, v.391, n.2, p.105-126, May.

CURTIS, L.R. et al. (1991). Disposition and elimination of 17 α -methyltestosterone in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v.99, n.1/2, p.193-201, Nov.

DE ROSE, E.H. et al. (2004). Controle antidoping no Brasil: resultados do ano de 2003 e atividades de prevenção. **Revista Brasileira de Medicina no Esporte**, São Paulo, v.10, n.4, p.289-293, jul./ago.

DEVLIN, R.H.; NAGAHAMA, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, Amsterdam, v.208, n.3/4, p.191-364, June.

DUARTE, K.M.R.; SILVA, F.M.S.M.; MEIRELLES, C.F. (2002). Resíduos de anabolizantes na produção animal: importância e métodos de detecção. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.4, p.731-737, jul./ago.

EGLI, H. et al. (2003). Minimum requirements for reporting analytical data for environmental samples (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v.75, n.8, p.1097-1106.

ELMOOR-LOUREIRO, L.M.A. (1997). **Manual de identificação de cladóceros límnicos do Brasil**. Brasília: Universa.

EL- SAYED, A.F.M. (1999). Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis spp.* **Aquaculture**, Amsterdam, v.179, n.1/4, p.149-168, Sept.

ESTEVEZ, F.A. (1988). **Fundamentos de limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência; FINEP.

EXPLOREVALE (2003). Disponível em: <<http://www.explorevale.com.br/circuitodasaguas/socorro/index.htm>>. Acesso em: 15 out. 2006.

FALONE, S.Z.; VIEIRA, E.M.; ONUSKA, F.I. (2006). Adsorption study of RDX and TNT explosives in soils by HPLC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, New York, v.29, n.11, p.1645-1662.

FALONE, S.Z. et al. (2006). Use of the hormone 17 α -methyltestosterone in the sexual reversion of tilapias (*Oreochromis niloticus*). In: TAFT, C.A. **Modern biotechnology in medicinal chemistry and industry**. Kerala: Research Signpost. p.173-182.

FERNICOLA, N.A.G.G.; BOHRER-MOREL, M.B.C.; BAINY, A.C.D. (2003). Ecotoxicologia. In: AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. **As Bases ecotoxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa; São Paulo: Intertox.

GALLI, L.F. (1981). **Introdução à piscicultura**. São Paulo: Fundação Cargill.

GOMES, R.L. et al. (2004). Steroid estrogen determination in sediment and sewage sludge: a critique of sample preparation and chromatographic/mass spectrometry considerations, incorporating a case study in method development. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v.23, n.10/11, p.737-744.

GOMESLSKY, B. et al. (1994). Hormonal sex inversion in the common carp (*Cyprinus carpio* L). **Aquaculture**, Amsterdam, v.126, n.3/4, p.265-270, Oct.

GONZALO-LUMBRELAS, R.; IZQUIERDO-HORNILLOS, R. (2003). Optimization and validation of conventional and micellar LC methods for the analysis of methyltestosterone in sugar-coated pills. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v.31, n.1, p.201-208, Feb.

GRAEFF, A.; AMARAL JUNIOR, H. (2004). Produção de juvenis de Tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) em tanque-rede como opção econômica para regiões de clima desfavorável para engorda rural. In: CONGRESSO IBEAMERICANO VIRTUAL DE ACUICULTURA COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA, 3., 2004, Local do evento. Disponível em: <<http://www.civa2004.org>>. Acesso em: 24 fev. 2007.

GRANZIERA, M.L.M. (2003). **Direito de águas**. 2.ed. São Paulo: Atlas.

GREEN, B.W.; TEICHERT-CODDINGTON, D.R. (2000). Human food safety and environmental assessment of the use of 17 α -Methyltestosterone to produce male Tilapia in the United States. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v.31, n.3, p.338-357.

GREEN, J.M. (1996). A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry News & Features**, Washington, v.68, p.305A-309A, May.

GUARATINI, C.C.I.; ZANONI, M.V.B. (2000). Corantes têxteis. **Química Nova**, São Paulo, v.23, n.1, p.71-78, jan./fev.

- GUIMARÃES, L.F.L. (1987). Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 2.ed. Campinas: UNICAMP. p.179-243.
- GULLEY, D.D.; BOELTER, A.M.; BERGMAN, H.L. (1991). **Totxtat 3.3 computer program**. [S.l.:s.n.]
- HARRIS, D.C. (2001). **Análise química quantitativa**. 5.ed. Rio de Janeiro: LTC.
- HEPHER, B.; PRUGININ, Y. (1981). **Commercial fish farming**. New York: Wiley.
- HUET, M. (1978). **Tratado de piscicultura**. 2.ed. Madrid: Mundi-Prensa.
- HUTCHINSON, T. H.; et al. (2006). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v.76, n.1, p.69-92. Jan.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (2004). Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 31 ago. 2006.
- INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (2003). **DOQ-CGCRE-008**. Disponível em:<<http://www.inmetro.gov.br>>. Acesso em: 4 abr. 2006.
- JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H.; GUIMARÃES, L.F.L. (2006). Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP. p.273-397.
- JENKE, D.R. (1998). Chromatography method validation: a review of current practices and procedures. Part II. Guidelines for primary validation parameters. **Instrumentation Science & Technology**, Monticello, v.26, n.1, p.1-18.
- KARAYÜCEL, I. et al. (2003). Thermal and hormonal feminization of all male YY Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **The Israeli Journal of Aquaculture**, Bamidged, v.55, n.2, p.114-122.
- KASHIAN, D.R.; DODSON, S.I. (2004). Effects of vertebrate hormones on development and sex determination in *Daphnia magna* **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v.23, n.5, p.1282-1288.
- KOREA INSTITUTE SCIENCE & TECHNOLOGY (2006). O.S.KWON; H.J.KIM. Method for measuring trace methyltestosterone in blood sample using gas chromatography/mass selective detector. KR2006071772-A, 26 Jun.
- KORINEK, V.; FREY, D.G. (1991). **Biology of cladocera**. Dordrecht: Kluwer Academic.

- KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J.H. (1976). **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois.
- KUBITZA, F. (1999). **Qualidade da água na produção de peixes**. Jundiaí: Acqua & Imagem.
- LANÇAS, F.M. (2004a). **Extração em fase sólida**. São Carlos: RiMa.
- _____. (2004b). **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa.
- LeBLANC, G.A.; MU, X.; RIDER, C.V. (2000). Embryotoxicity of the alkylphenol degradation product 4-nonylphenol to the Crustacean *Daphnia magna*. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v.108, n.12, p.1133-1138.
- LEITE, F. (1996). **Validação em análise química**. Campinas: Átomo.
- LISE, M.L.Z. et al. (1999). O Abuso de esteróides anabólico-androgênicos em atletismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.45, n.4, p.364-370, set./out.
- MACÊDO, J.A.B. (2004). **Águas & águas**. Belo Horizonte: CRQ-MG.
- MAINARDES-PINTO, C.S.R. et al. (2000). Masculinization of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, using different diets and different doses of 17 alpha-methyltestosterone. **Revista Brasileira de Zootecnia=Brazilian Journal of Animal Science**, Viçosa, v.29, n.3, p.654-659, maio/jun.
- MARWAH, A.; MARWAH, P.; LARDY, H. (2005). Development and validation of a high performance liquid chromatography assay for 17 α -methyltestosterone in fish feed. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.824, n.1/2, p.107-115, Sept.
- MASUTTI, M.B.; ESPÍNDOLA, E.L.G. (2005). Bioacumulação de Cr e Cu em *O. niloticus* em experimentos em Mesocosmos. In: ESPÍNDOLA, E.L.G.; WENDLAND, E. **Trajетórias e perspectivas de um curso multidisciplinar**. São Carlos: RiMa. v.4, p.427-440.
- McFARLAND, V.A.; CLARKE, J.L. (1989). Environmental occurrence abundance and potencial toxicity of polychlorinated biphenyl congeners: considerations for a congener specific analysis. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v.81, p.225-239, May.
- McKINNEY, A.R.; SUANN, C.J.; STENHOUSE, A.M. (2007). A Stereochemical examination of the equine metabolism of 17 α -methyltestosterone. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.581, n.2, p.377-387, Jan.
- McNAIR, H.M.; GALHIANE, M.S.; LANÇAS, F.M. (1985). Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Revista de Química Industrial**, Rio de Janeiro, v.54, p.21-26, nov.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Secretaria de Defesa Agropecuária (2003). Instrução normativa nº 46, de 10 de junho de 2003 – regulamento técnico MERCOSUL sobre critérios para validação de métodos analíticos. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2255>>. Acesso em: 18 jul. 2006.

MONTAGNOLLI, W. et al. (2004). Poluição ambiental associada à aquicultura. In: ESPÍNDOLA, E.L.G.; WENDLAND, E. **Bacia hidrográfica**: diversas abordagens em pesquisas. São Carlos: RiMa. v.3, p.126-140.

MOREIRA, R.C.A.; BOAVENTURA, G.R. (2003). Referência geoquímica regional para a interpretação das concentrações de elementos químicos da bacia do Lago Paranoá-DF. **Química Nova**, São Paulo, v.26, n.6, p.812-820, nov./dez.

ODA, S.; TATARAZAKO, N.; WATANABE, H.; MORITA, M.; IGUCHI, T. Production of male neonates in four cladoceran species exposed to a juvenile hormone analog, fexucarb. **Chemosphere**, Oxford, v. 60, N.1, p. 74-78, 2005.

OLEA-SERRANO, N. et al. (2002). Endocrine disrupting chemicals. Harmful substances and how to test them. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.18, n.2, p.489-494, Apr.

OLIVARES, I.R.B. (2006). **Gestão de qualidade e laboratórios**. Campinas: Átomo.

PANDIAN, T.J.; SHEELA, S.G. (1995). Hormonal induction of sex reversion in fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v.138, n.1/4, p.1-22, Dec.

PARK, J. (2005). **Pharmaceuticals in the environment and management approaches in Korea**. Korea: Environment Institute.

PARROTT, J.L.; WOOD, A.S. (2002). Fathead minnow lifecycle tests for detection of endocrine-disrupting substances in effluents. **Water Quality Research Journal Canada**, Gatineau, v.37, n.3, p.651-667.

PAWLOWSKI, S. et al (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17 α -methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v.68, n.3, p.277-291, june.

PEIXEVITAL (2006). Disponível em: <www.peixevital.com.br/img/foto02.jpg>. Acesso em: 14 fev. 2006.

PELÁEZ-RODRIGUEZ, M. et al. (2002). Análise da qualidade da água e aplicação do índice de proteção da vida aquática (IVA) em duas sub-bacias da bacia hidrográfica do Rio Jacaré-Guaçu. In: ESPÍNDOLA, E.L.G. **Ecotoxicologia**: perspectiva para o século XXI. São Carlos: RiMa. v.1, p.95-114.

- PENNAK, R.W. (1989). **Fresh-water invertebrates of the United States (Protozoa to Mollusca)**. 3thed. Colorado: John Wiley.
- PEZZATO, L.E.; SCORVO FILHO, J.D. (2000). Situação atual da aqüicultura na região Sudeste. In: VALENTI, W.C. et al. (Ed.). **Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPq; Ministério da Ciência e Tecnologia. p.303-319.
- POLITO, W.L. (2002). **Validação em análise química**. São Carlos: USP. Apostila.
- RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. (1985). **Fundamentals of aquatic toxicology methods and applications**. Washington: Hemisphere.
- RAND, G.M.; WELLS, P.G.; McCARTHY, L.S. (1995). Introduction to aquatic toxicology. In: RAND, G.M. (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology. effects, environmental fate ad risk assessment**. 2nded. Washington: Taylor & Francis. p.3-67.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. (1997). **Farmacologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- REIS FILHO, R.W.; ARAÚJO, J.C.; VIEIRA, E.M. (2006). Hormônios sexuais: contaminantes bioativos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n.4, p.817-822.
- RIBANI, M. et al. (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v.27, n.5, p.771-780, set./out.
- RIEDER, A. et al. (2000). Alterações no teor de matéria orgânica de solos e provável efeito no poder de proteção ambiental nas bordas do pantanal diante da poluição por pesticidas. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v.10, p.87-112, jan./dez.
- RIVERA-ARCE, J.C. et al. (2006). Central effects of the anabolic steroid 17 α methyltestosterone in female anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, New York, v.84, n.2, p.275-281, June.
- ROCHA, O.; GÜNTZEL, A. (2006). Crustáceos branquiópodos. São Carlos: UFSCar. Apostila.
- ROTHBARD, S. et al. (1990). Clearence of 17 α -ethynyltestosterone from muscle of sex-inversed tilapia hybrids treated for growth enhancement with two doses of the androgen. **Aquaculture**, Amsterdam, v.89, n.3/4, p.365-376, Sept.
- SCHIEL, D.; SANTOS, S. A. M.; RUFFINO, P. H. P.(2000). Guia kit análise da água. Centro de Divulgação Científica e Cultural (CDCC)-USP-São Carlos-SP.

SHABIR, G.A. (2003). Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis- Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.987, n.1/2, p.57-66, Feb.

SIGRH (2001). Disponível em:<<http://www.sigrh.sp.gov.br/sigrh/basecon/congressocomitesdebacia/cddaee/t extocompletomelhorespraticas/9.doc>>. Acesso em: 4 dez. 2006.

SILVA, P.R.P.; DANIELSKI, R.; CZEPIELEWSKI, M.A. (2002). Esteróides anabolizantes no esporte. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v.8, n.6, p.235-246, nov./dez.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. (2002). **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman.

SOUZA, S.R. et al. (2004). Diferentes fontes protéicas de origem vegetal para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) durante a reversão sexual. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v.26, n.1, p.21-28.

STOLKER, A.A.M. et al. (1999). Supercritical fluid extraction of methyltestosterone, nortestosterone and testosterone at low ppb levels from fortified bovine urine. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.726, n.1/2, p.121-131, Apr.

TACHIBANA, L. et al. (2004). Desempenho de diferentes linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase da reversão sexual. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v.26, n.3, p.305-311.

TAVARES, M.C.H. (1996). Estudo da adsorção-dessorção da trifluralina em solo e em ácido húmico. **Química Nova**, São Paulo, v.19, n.6, p.605-608.

TEICHERT-CODDINGTON, D.; MANNING, B.; EYA, J. (2000). Concentration of 17 α -Methyltestosterone in hormone-treated feed: effects of analytical technique, fabrication, and storage temperature. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v.31, n.1, p.42-50.

THERON, H.B. et al. (2004). Selective and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of levonorgestrel in human plasma. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.813, n.1/2, p.331-336, Dec.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v.74, n.5, p.835-855.

TOYAMA, G.N.; CORRENTE, J.E.; CYRINO, J.E.P. (2000). Suplementação de vitamina C em rações para reversão sexual da tilápia do Nilo. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.57, n.2, p.221-228, abr./jun.

- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1998). **Research plan for endocrine disruptors**. Washington: Office of Research and Development. (EPA/600/R-98/087).
- URONEWS (2000). Disponível em:<www.uronews.org.br/68_uro/68_beneficios.htm>. Acesso em: 12 July 2002.
- VENDEMIATTI, J.A.; COSTA, A.B.; CYRINO, J.E.P. Mananoligossacarídeos alimentares (MOS) como agentes profiláticos das infecções por *Edwardsiella tarda* em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). In: CONGRESSO INTERNACIONAL VIRTUAL DE ACUICULTURA, 2., 2003, Zaragoza. **Anais eletrônicos...** Disponível em:<<http://www.civa2003.org>>. Acesso em: 24 february 2007.
- VICK, A.M. (1999). **Methyltestosterone: pharmacokinetics, oral bioavailability, and residue depletion in rainbow trout**. M.Sc.Dissertation - College of Pharmacy, The Ohio State University, Ohio, 1999.
- VAN ZONEN, P. et al (1999). Some practical examples of method validation in the analytical laboratory. **Trends in analytical chemistry**, v.18, n.9/10.
- VON SPERLING, M. (1996). **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgoto**. 2.ed. Belo Horizonte: UFMG.
- WASON, S. et al. (2003). 17 α -methyltetosterone: 28-day oral toxicity study in the rat based on the "Enhanced OECD Test Guideline 407" to detect endocrine effects. **Toxicology**, Amsterdam, v.192, n.2/3, p.119-137, Nov.
- WASSERMANN, G.J.; AFONSO, L.O.B. (2003). Sex reversal in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus Linnaeus*) by androgen immersion. **Aquaculture research**, Oxford, v.34, n.1, p.65-71, Jan.
- WEAST, R. C. Crc Handbook of Chemistry and Physics. Boca Raton, CRC Press, 1988, 1v.
- WEBSTER K.E. et al. (1992). Complex biological responses to the experimental acidification of Little-Rock lake, Wisconsin, USA. **Environmental Pollution**, London, v.78, n.1/3, p.73-78.
- XIE, Z.H. et al. (2005). Determination of methyltestosterone using flow injection with chemiluminescence detection. **Luminescence**, Chichester, v.20, n.3, p.231-235, May/June.
- ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (2006). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa.
- ZHANG, L.; BAER, K. N. The influence of feeding, photoperiod and selected solvents on the reproductive strategies of the water flea, *Daphnia magna*. **Environmental Pollution**. London, v. 110, p. 425-430, 2000.

ANEXO I

Água de Diluição- Água Natural (ABNT, 2005)

Para preparação da água de cultivo dos microcrustáceos, pode ser utilizada água de poço, não contaminada e de qualidade constante, entendendo-se como qualidade constante quando as variações mensais de dureza, alcalinidade e condutividade forem menores que 10% de suas respectivas médias e a variação mensal do pH for menor que 0,7 unidades de sua média. Medir a dureza total e, se necessário, acertar para a faixa requerida, de 40-48 mg L⁻¹ em CaCO₃ com soluções 1 e 2 (ANEXO II), considerando que para cada miligrama de dureza de água a ser aumentada, deve-se acrescentar 0,5 mL da solução 1 e 0,25 mL da solução 2 por um litro de água. A água deve passar por um processo de aeração de 24 horas e após isso, cessa-se o processo de aeração e deixa em repouso por um período de 3 horas. Para se verificar a solubilização e manutenção da saturação de oxigênio dissolvido, para que dados como dureza, pH e condutividade estejam na mesma faixa estipulada para a água de diluição, caso contrário a mesma deve ser desprezada. Após o ajuste do pH, que deve ser de 7,2-7,6, a água não pode ser aerada. A faixa estipulada para a condutividade deve ser de 160 µS cm⁻¹.

ANEXO II**Solução 1 e 2****Solução 1**

Sulfato de cálcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).....1,5 g
Dissolvido em água bideionizada ou destilada.....1000 mL

Solução 2

Cloreto de potássio (KCl).....0,2 g
Bicarbonato de sódio (NaHCO_3).....4,8 g
Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).....6,1 g
Dissolvidos em água bideionizada ou destilada..... 1000 mL

ANEXO III (CETESB, 1992)**• Determinação da Dureza ($\text{mg L}^{-1} \text{CaCO}_3$) das soluções-teste**

1. Adicionou-se 50 mL das amostras de soluções-teste em um erlenmeyer de 125 mL mais 1 mL da solução tampão e o indicador negro de ericromo T;
2. Titulou-se com EDTA 0,01 M até o ponto de viragem do rosa para o azul;
3. Calculou-se a dureza (mg L^{-1} de CaCO_3) de acordo com a fórmula apresentada a seguir:

$$Dureza = \frac{\text{Volume de EDTA (mL)} \times 0,01 \times 1000 \times 100,09}{\text{Volume da amostra (mL)}}$$

Como se usa 50 mL de amostra para a titulação, a fórmula pode ser resumida na seguinte:

$$Dureza = \text{Volume de EDTA (mL)} \times 20,018$$

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)