



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Debora Queiroz Cabral

**Bases conceituais e ferramentas analíticas à determinação do impacto do estrógeno 17 α -
etinilestradiol no metaboloma da alga *Ulva lactuca* (Chlorophyta)**

Florianópolis
2019

Debora Queiroz Cabral

**Bases conceituais e ferramentas analíticas à determinação do impacto do estrógeno 17 α -
etinilestradiol no metaboloma da alga *Ulva lactuca* (Chlorophyta)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do título de doutora em
Biotecnologia e biociências.
Orientador: Prof. Marcelo Maraschin, Dr.

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cabral, Debora Queiroz

Bases conceituais e ferramentas analíticas à determinação do impacto do estrógeno 17 β -etinilestradiol no metaboloma da alga *Ulva lactuca* (Chlorophyta) / Debora Queiroz Cabral ; orientador, Marcelo Maraschin, 2019.

198 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. 17 β -etinilestradiol .
3. *Ulva lactuca* . 4. Metaboloma. 5. Bioinformática. I.
Maraschin, Marcelo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

Debora Queiroz Cabral

Bases conceituais e ferramentas analíticas à determinação do impacto do estrógeno 17 α -etinilestradiol no metaboloma da alga *Ulva lactuca* (Chlorophyta)

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Sidnei Moura, Dr.

Universidade de Caxias do Sul

Prof. Paulo Antunes Horta, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Daniel Santos Mansur, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Robson Ventura de Souza, Dr.

Centro de Desenvolvimento em Aquicultura e Pesca / Epagri

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Biotecnologia e Biociências.

Prof. Glauber Wagner, Dr.

Coordenador do Programa

Prof. Marcelo Maraschin, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2019.

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais Lilio Chaves Cabral e Telma Vindoura Queiroz Cabral.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Lilio Chaves Cabral e à minha mãe Telma Vindoura Queiroz Cabral pelo apoio e amor incondicionais. À minha avó Maria Luiza de Carvalho Queiroz pelo exemplo de vida, pelas orações e amor sem tamanho.

Às minhas irmãs Lilian Cabral Araújo e Barbara Cabral Penner por todo carinho, cuidado e incentivo sempre. Às minhas amigas-irmãs que constantemente me incentivaram e ornamentaram os períodos mais tensos com momentos leves e divertidos, fundamentais durante esse processo.

Ao meu orientador, o professor Marcelo Maraschin, a quem admiro como profissional e amigo.

Aos meus colegas e amigos do LMBV com quem pude aprender e crescer junto. De forma especial à Dani Souza Coelho e Deise Munaro, cujo bom humor mesmo nos momentos difíceis foram importantes nesse final. Obrigada por fazerem parte disso. À Fernanda Ramlov, que pacientemente me orientou em várias das técnicas abordadas neste documento, deixo aqui o meu agradecimento e carinho.

Aos professores Paulo Horta e Leila Hayashi por me receberem no Laboratório de Ficologia e no Laboratório de algas do LCM nos primeiros anos do doutorado, por compartilharem conhecimento e tempo, além de espaço e recursos. O aprendizado diário com os colegas, e aqui destaco a Ticiane Rover, o Vitor Pontinha e o Eduardo Bastos, juntamente à troca de experiências nos ensaios que deram certo, e ainda mais nos que deram errado, foram fundamentais no desenvolvimento da tese e no conhecimento acumulado que hoje carrego.

À Beatriz Veleirinho e à professora Shirley Kuhnen por abrirem as portas do Laboratório Integrado de Bioquímica e Morfofisiologia Animal da UFSC.

À Silvana Rocco e ao Maurício Sforça nas pernas ao Laboratório Nacional de Biociências, de quem a atenção e disponibilidade certamente fez toda a diferença. O profissionalismo dessa dupla é sem dúvida inspirador.

Ao professor Miguel Rocha pela convivência, confiança e aprendizado na Universidade do Minho. Aos colegas BISBII (*Bioinformatics and Systems Biology Interdisciplinary Initiative*) com quem tive a oportunidade de conviver e aprender. Ao Hugo, que me orientou na SilicoLife em Braga, e especialmente à Sara Cardoso e Rebeca Souto Santos pela amizade, colaboração científica e parceria para vivenciar a cultura e os cenários naturais em Portugal.

Agradeço àqueles que torceram, que oraram, que acreditaram.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências e à Capes pelo suporte financeiro por meio de bolsas e/ou custeio de cursos e estágios em outras cidades.

E agradeço especialmente a Deus, por me trazer até aqui, por criar novas e inusitadas oportunidades de aprendizado, por me abrir o entendimento para coisas que não entendia, por me ensinar a amar as diferenças, e a superar as dificuldades. OBRIGADA.

RESUMO

O estrógeno 17α -Ethinilestradiol (EE2) configura um importante poluente em ambientes aquáticos por promover a disrupção endócrina em diversos organismos e também no homem. Eliminado via fezes ou urina por mulheres que fazem uso de contraceptivos orais, o composto tem sido comumente reportado em rios, águas superficiais, lagoas, estuários e baías em áreas urbanas, alcançando inclusive ambientes costeiros protegidos, como observado neste estudo por meio de análises imuno-enzimáticas (ELISA). Dados sobre a presença de EE2 em ambientes costeiros e marinhos ainda são escassos na literatura e foram aqui abordados. Em amostras de água marinha (praias de Canasvieiras e Ingleses) EE2 foi ausente ou abaixo do limite de detecção (LOD), no entanto, na foz do Rio Capivari (praia dos Ingleses) foram encontradas concentrações maiores às concentrações de não efeito (PNECs) propostas para peixes e outros organismos aquáticos. EE2 também foi detectado nas fozes do rio Sangradouro e no Riozinho do Campeche no verão e no outono, e nas duas lagoas costeiras amostradas, a Lagoa da Conceição, situada parcialmente em área fortemente urbanizada, e a Lagoa do Peri, protegida por Lei municipal e que abastece parte da população do sul e leste da ilha de Florianópolis. Neste estudo, somente a fração conjugada do EE2 foi considerada. Reportada como a menor fração em efluentes domésticos, esta forma do EE2 pode rapidamente voltar à sua forma livre e biologicamente ativa mediante a ação de microrganismos presentes no efluente e em ambientes naturais, de forma que a concentração total do hormônio identificado deve ser consideravelmente maior que o reportado neste documento. Em revisão, o trabalho apresenta o estado da arte do conhecimento à presença do EE2 em águas brasileiras. A macroalga *Ulva lactuca* foi utilizada como candidata à indicadora ambiental da presença do estrógeno no ambiente marinho. Mediante os resultados encontrados via RMN e ELISA, inexistem indícios de bioacumulação do hormônio no tecido da alga, no entanto, foram detectadas alterações na concentração de carotenoides e clorofila em amostras algais expostas a altas concentrações do estrógeno (0,001 a 1 mg/L) por 48h. Este é o primeiro trabalho que aponta alterações de qualquer natureza em macroalgas expostas ao EE2, contudo, mais informações sobre a ação do estrógeno sobre o metaboloma da alga são requeridas para indicá-la como bom bioindicador, ainda mais, comparada a outros organismos da fauna aquática que respondem a concentrações muito menores às testadas neste estudo. Análises bioinformáticas de dados espectrais ^1H -RMN das amostras indicam pouca ou nenhuma alteração significativa do endometaboloma da alga mediante a exposição ao estrógeno, porém, para o exometaboloma, o modelo analítico utilizado identificou 23 ressonâncias responsáveis pelo agrupamento das amostras expostas. O trabalho ainda apresenta contribuição promissora à análise bioinformática para identificação de compostos em matrizes brutas analisadas via RMN, por meio da compilação de um banco de metabólitos voltado para a espécie de interesse. A base de dados poderá ser dinamicamente alimentada com novos compostos e outros modelos biológicos, otimizando a identificação automatizada de metabólitos de organismos alvo a partir de dados espectrais ^1H -RMN como observado neste documento para *U. lactuca*.

Palavras-chave: 17α -etinilestradiol. Bioinformática. *Ulva lactuca*.

ABSTRACT

Estrogen 17 α -Ethinylestradiol (EE2) is an important pollutant in aquatic environment due to endocrine disruption effects in many organisms and in humans. Eliminated via faeces or urine by women on oral contraceptives, the compound has been commonly reported in rivers, surface waters, lakes, estuaries and bays in urban areas, and also protected coastal environments, as observed in this study through enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Data on the presence of EE2 in coastal and marine environments are still scarce in the literature and is addressed here. In marine water samples (Canasvieiras and Ingleses beaches), EE2 was absent or below the limit of detection (LOD), however, at the Capivari River mouth (Ingleses beach) higher concentrations than predicted no-effect concentration (PNEC) proposed for fish and other aquatic organisms were found. EE2 was also detected in the Sangradouro River and Riozinho do Campeche mouths in summer and autumn, and also in two coastal lagoons, Lagoa da Conceição, partially situated in a heavily urbanized area, and Lagoa do Peri, protected by Municipal Law and water supplier for part of the population from the south and east of Florianópolis island. In this study, only the conjugated fraction of EE2 was considered. Reported as the smallest fraction in domestic effluents, this form of EE2 can quickly return into its free and biologically active form through the action of microorganisms present in the effluent and in natural environments, in that way, the total amount for EE2 must be considerably higher than the concentration reported in this document. In review, this study provides the state of the art in the presence of EE2 in Brazilian waters. The macroalgae *Ulva lactuca* was tested as a candidate for the environmental indicator of the presence of estrogen in the marine environment. Based on NMR and ELISA results, there is no evidence of hormone bioaccumulation in algal tissue. However, changes in carotenoid and chlorophyll contents were detected in algal samples exposed for 48h to high estrogen concentrations (0.001 to 1 mg/L). This is the first known work to point out changes of any nature in macroalgae exposed to EE2, however, more information about estrogen effects on algal metabolome is needed to indicate it as a good bioindicator, moreover when compared to wild fauna organisms which respond to much lower concentrations than tested doses considered in this study. In addition, bioinformatic analyzes of ¹H-NMR spectral samples data indicate little or no significant alteration of algal endometabolome exposed to EE2. However, for exometabolome, the used analytical model identified 23 resonances responsible for grouping the exposed samples on hierarchical analysis. The study also presents a promising contribution to bioinformatic analysis on the identification of metabolites in crude matrices analyzed by NMR by compiling a metabolite database for species of interest. The database could be dynamically fed with new compounds and other biological models. This tool optimizes automated identification of metabolites from ¹H-NMR spectral data as observed herein for *U. lactuca*.

Keywords: 17 α -Ethinylestradiol. Bioinformatic. *Ulva lactuca*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estimativa da excreção de EE2. Todos os valores mostrados são aproximados e o número resultante não equivale a 100% do original ingerido de EE2.....	29
Figura 2: Estrutura química de estrógenos esteroidais naturais (E1, E2, E3) e sintético (EE2).....	34
Figura 3: Fases do cultivo de <i>Ulva lactuca</i> . (A) células reprodutivas em suspensão; (B) observação de aglomerados de células reprodutivas, escala do detalhe = 1 μm ; e (C) conglomerados com frondes desenvolvidas e aptas à repicagem, escala do detalhe = 5 mm.	52
Figura 4: Representação gráfica sobre dados de identificação e quantificação do EE2 no Brasil.....	56
Figura 5: Pontos amostrais das coletas de água e de alga em Florianópolis, SC.	60
Figura 6: Curva padrão de EE2 utilizada ao ajuste do modelo de regressão não-linear (<i>3-parameter asymptotic exponential</i>) para estimar as concentrações daquele analito em amostras de água.....	64
Figura 7: Análise de componentes principais para (A) estações do ano e (B) balneabilidade.....	68
Figura 8: Foz do Rio Sangradouro após as 16h no verão. A imagem apresenta o ponto de coleta do Rio Sangradouro e destaca considerável número de visitantes banhando-se em suas águas mesmo em dia parcialmente nublado.	70
Figura 9: Número total de referências da literatura para ambientes amostrais no Brasil, onde estudos de identificação de EE2 em matrizes aquosas e de sedimentos foram conduzidos. Como alguns estudos realizaram análises em mais de um ambiente, o somatório de referências ultrapassa o número de publicações consultadas.....	72
Figura 10: Arco praial direito da Lagoa do Peri. A imagem ilustra o fim de tarde (~ 18h) no ponto amostral durante o verão, com expressivo número de banhistas.	75
Figura 11: Análise de componentes principais para (A) estações do ano e (B) balneabilidade.....	77
Figura 12: Perfis espectrais de varredura UV-visível (350-700 nm) dos extratos algais (etanol 70%, v/v) no experimento 1 (0 e 1mg EE2/L, 48h).	87

Figura 13: Perfis espectrais de varredura UV-visível, com detalhe da janela espectral de 350 a 550 nm, dos extratos hidroalcoólicos de *U. lactuca*, consoante aos tratamentos com EE2, e do padrão de xantofila..... 88

Figura 14: Identificação de comprimentos de ondas relevantes à discriminação do endometaboloma de amostras de *Ulva lactuca* expostas ao EE2, detectados pela análise de *fold change*, a partir dos dados de absorbâncias (UV-Vis, 350 a 700 nm) de extratos hidroalcoólicos. Em azul: diferenças significativas (círculos azuis) da intensidade relativa (definida como uma mudança ≥ 2 vezes) dos sinais de absorbância relevantes à discriminação das amostras (*threshold* = 0,005) 89

Figura 15: Análise de componentes principais (PCA) dos dados de absorbâncias (UV-vis - 350 a 700 nm) dos extratos hidroalcoólicos de *Ulva lactuca*, após exposição *in vitro* ao EE2. Detalhes para concentração (0 e 1 mg/L) e exposição (0 e 48 h) das amostras. 90

Figura 16: Concentração média de carotenoides totais (barras, eixo primário, CAR1 = concentração em ng.L^{-1} calculado a partir da absorbância em 438 nm; CAR2 = concentração em ng.L^{-1} calculado a partir da absorbância em 466 nm) e valores médios de absorbâncias para os comprimentos de onda de máxima absorção para as clorofilas *a* e *b* no extrato hidroalcoólico de *Ulva lactuca* (linhas, eixo secundário, CHLa = 664 nm; CHLb = 648 nm, LICHTENTHALER; BUSCHMANN, 2001). Barra de erros = desvio padrão. 91

Figura 17: Cromatograma (HPLC) do padrão de xantofila (concentração do exemplo = 1.56 $\mu\text{g/ml}$), apontando a luteína como composto majoritário (área Fração 1 = 6,19 \pm 0,03 mAU*min, 97,7 \pm 1.1%) e dois outros picos minoritários (área Fração 2= 0,10 \pm 0,01 mAU*min, 1.6 \pm 0,2%; área Fração 3= 0,08 \pm 0,00 mAU*min, 1.4 \pm 1.1%). 94

Figura 18: Curvas-padrão de luteína (A - 0,20 a 6,10 ng/g) e dos compostos minoritários (B - luteína esterificada - 0,003 a 0,099 ng/g) utilizadas ao cálculo da concentração daqueles metabólitos em amostras do endometaboloma de *Ulva lactuca* expostas ao EE2. 94

Figura 19: Cromatogramas de extratos hidroalcoólicos de amostras de *Ulva lactuca* expostas ao estrógeno sintético 17 α -etinilestradiol (1 mg/L). Os cromatogramas das colunas da esquerda e da direita são representativos de perfis metabólicos de amostras coletadas às 0h e 48h de exposição ao xenobiótico, respectivamente. Legendas dos tratamentos na (Tabela 7). 96

Figura 20: Espectro de massas (injeção direta, fonte APPI, modo positivo, 200-1000 *m/z*) do padrão de xantofila indicando o íon *m/z* 551 atribuído à luteína. 97

Figura 21: Concentrações dos compostos (eixo y = ng/g) luteína e SB2 e SB3 nos extratos hidroalcoólicos de *Ulva lactuca* exposta ao EE2 (eixo x = ng/L;), nos tempos amostrais

de 0h e 48h (quadros à esquerda e à direita, respectivamente). Barra de erros = desvio padrão.

.....	100
Figura 22: Região do espectro ^1H -RMN de (A) exo- e (B) endometaboloma que destaca a região do solvente (metanol- d_4) não considerada na análise quimiométrica (3.25-3.35 ppm), bem como os sinais que coincidem com ressonâncias do efeito de relaxação normalmente observados próximo ao sinal do solvente ou a outros sinais de grande intensidade.	114
Figura 23: Exemplo de um espectro completo (0,0-13,0 ppm) do endometaboloma (MExp_2) a partir das informações presentes nas tabelas de picos (A) antes e (B) depois do processamento (<i>autoscaling</i>). Cores representam as concentrações dos tratamentos (CTRL= 0 ng/L; 1 = 1.000 ng/L; e 10 = 10.000 ng/L).....	115
Figura 24: Fluxograma do processamento espectral e etapas de pós-processamento na análise de dados ^1H -RMN.	116
Figura 25: Visualização das etapas para a construção do banco de dados.....	120
Figura 26: Espectros de ^1H RMN do EE2 adquiridos nos solventes (A) clorofórmio- d ; B) acetona- d_6 ; (C) metanol- d_4 ; e (D) DMSO- d_6 , e atribuições aos átomos de referência daquele composto.	129
Figura 27: Amplitude dos deslocamentos para cada sinal característico do EE2 nos diferentes solventes.....	130
Figura 28: Numeração dos átomos de hidrogênio do EE2, conforme apresentação das atribuições na Tabela 18 e Figura 26 (numeração dos átomos sugerida automaticamente pelo software ACD/NMR Processor a partir da designação do composto).	141
Figura 29: Região aromática (5,5-8,5 ppm) das amostras controle sem e com etanol, nos tempos 0 e 48h do exometaboloma (MExp_1).	142
Figura 30: Região aromática (5,5-8,5 ppm) das amostras tratadas com (A) e sem (B) etanol, nos tempos 0 e 48h do exometaboloma (MExp_1).	142
Figura 31: Região anomérica (3-5.5 ppm) das amostras controle sem e com etanol, nos tempos 0 e 48h do exometaboloma (MExp_1).	143
Figura 32: Região anomérica (3-5.5 ppm) das amostras tratadas com (A) sem e (B) com etanol, nos tempos 0 e 48h do exometaboloma (MExp_1).	143
Figura 33 Região alifática (0-3 ppm) das amostras controle sem e com etanol, nos tempos 0 e 48h do exometaboloma (MExp_1).	144
Figura 34 Região alifática (0-3 ppm) das amostras tratadas com (A) sem e (B) com etanol, nos tempos 0 e 48h do exometaboloma (MExp_1).	144

Figura 35: Agrupamento hierárquico resultante da análise de dados de ^1H RMN (0,20 - 13,00 ppm) de amostras de endo- e exometaboloma de *Ulva lactuca* expostas a EE2 por 0h e 48h. 145

Figura 36: Análise hierárquica entre as amostras do exometaboloma (MExp_1) considerando o espectro completo, sendo a discriminação de cores em função da exposição ao EE2 (verde = 1ng/L; laranja = controle) e as regiões aromáticas, anoméricas e alifáticas,. Nestas, o fator discriminante das cores é a presença (verde) ou a ausência (laranja) da alga. A análise considerou como métrica de distância de pearson e as médias como método de aglomeração..... 148

Figura 37: Análise hierárquica entre as amostras do endometaboloma (MExp_2) considerando o espectro completo e as regiões aromáticas, anoméricas e alifáticas. Fator discriminante representado pelas cores é a concentração de EE2 a que a alga *Ulva lactuca* foi expostas ao longo do tempo (24h, 48h, 96h, e 144h). verde = 1.000 ng/L; laranja = 10.000 ng/L e lilás = controle. A análise considerou como métrica de distância de pearson e as médias como método de aglomeração 150

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Resumo das características do estrógeno 17α -etinilestradiol importantes para sua distribuição no ambiente	50
Quadro 2: Resumo dos resultados conforme obtidos pela função <i>coef()</i> utilizada em linguagem R, que resume os coeficientes <i>a</i> , <i>b</i> e <i>c</i> (<i>Parameters</i>) obtidos na regressão e que serão usados para o cálculo das concentrações das amostras (<i>ln_conc</i> = logaritmo natural das concentrações da curva; <i>kit_abs</i> = absorbâncias a 450 nm dos pontos da curva; <i>a</i> , <i>b</i> e <i>c</i> (<i>Formula</i>) = parâmetros iniciais estimados pela autora para ajuste do modelo aos dados da curva (Crawley, 2013).....	66
Quadro 3: Critérios para a atribuição de <i>score</i> utilizado pelo algoritmo para identificação de compostos.....	132
Quadro 4: Ressonâncias das diferentes regiões do espectro com $p < 0,05$ nos resultado da ANOVA para as amostras do endometaboloma (MExp_2) nos diferentes tempos amostrais (24h, 48h, 96h, 144h).	149

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físico-químicas dos estrógenos livres e conjugados.....	31
Tabela 2: Tempo de meia-vida (dias) calculada para o 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2) em ambientes sob condições aeróbicas e anaeróbicas.	33
Tabela 3: Índices de atendimento com água e esgotos por macrorregião brasileira e no município de Florianópolis referente ao ano de 2017.	35
Tabela 4: Efeitos do EE2 relatados em algas e plantas aquáticas, de acordo com literatura disponível no Portal Capes e artigos publicados em <i>open-access</i>	41
Tabela 5: Localização geográfica dos pontos amostrais e informações da maré no momento amostral, disponibilizados pelo Centro de Hidrografia da Marinha do Brasil, Florianópolis, 2019. Códigos das amostras: sum = verão, aut – outono.	61
Tabela 6: Concentração de EE2 (ng/L) em amostras de águas do mar e metadados: estação do ano, salinidade, coliformes fecais, balneabilidade e região geográfica, referente aos pontos de coleta na ilha de Florianópolis.	67
Tabela 7: Códigos e parâmetros dos tratamentos utilizados nos experimentos <i>in vitro</i> de análise do efeito do EE2 sobre o endometaboloma de <i>Ulva lactuca</i> , sendo tempo de exposição, concentração do EE2 no meio de cultivo, e concentração do etanol adicionado ao meio de cultivo.	87
Tabela 8: Percentual relativo (PR) entre os compostos majoritários observados por UHPLC.	98
Tabela 9: Coeficientes de correlação (r) entre os teores de compostos majoritários em extratos hidroalcoólicos de amostras de <i>Ulva lactuca</i> expostas a EE2 <i>in vitro</i>	99
Tabela 10: Valores de <i>p</i> resultantes do teste <i>t</i> de Student considerando os resultados em UHPLC a partir dos extratos hidroalcoólicos das amostras nos diferentes meios de cultura (com ou sem etanol 0,05%, v/v) e expostas a diferentes concentrações de EE2 (0 e 1 ml/L) nos momentos amostrais investigados (0 e 48h).	101
Tabela 11: Código das amostras e parâmetros considerados no Modelo experimental 1 (MExp_1), no qual a macroalga <i>Ulva lactuca</i> foi exposta ao estrógeno 17 α -etinilestradiol.	109
Tabela 12: Código das amostras e parâmetros considerados no Modelo experimental 2 (MExp_2), no qual a macroalga <i>Ulva lactuca</i> foi exposta ao estrógeno 17 α -etinilestradiol.	110

Tabela 13: Solventes usados para aquisição de espectros dos padrões, sua fórmula linear e deslocamentos químicos da água em cada um dos solventes e sinal do solvente (entre parênteses a multiplicidade dos solventes. A água aparece sempre como um singlete).	112
Tabela 14: Espécies algais que apresentam um ou mais metabólitos referenciados no <i>SPECMINE AlgaeDatabase</i>	124
Tabela 15: Número de metabólitos (SPCMNM) e espectros (SPCMNS) compilados a partir de bases de dados externos (BMRB, HMDB, MMCD e SDBS) e pessoal (OUR), por frequência (MHz).	125
Tabela 16: Número atual de espectros da base de dados SPCMNS apresentada por solvente e por frequência (MHz) de aquisição.	126
Tabela 17: Número atual de espectros da base de dados SPCMNS apresentada por intervalos de pH e por frequência (MHz) de aquisição.	126
Tabela 18: Atribuição dos átomos e deslocamentos químicos (H_Shift) do EE2 a partir de espectros de ¹ H RMN adquiridos em diversos solventes (acetona-d ₆ , clorofórmio-d, DMSO-d ₆ e metanol-d ₄), junto à média e desvio padrão (ppm) para os sinais observados nos quatro solventes.	128
Tabela 19: Lista dos 15 metabólitos mais prováveis do endometaboloma (MExp_2) ordenados pelos <i>scores</i> referentes unicamente ao <i>match</i> com picos localizados na região aromática.	134
Tabela 20: Lista dos 15 metabólitos mais prováveis do endometaboloma (MExp_2) ordenados pelos <i>scores</i> referentes unicamente ao <i>match</i> com picos localizados na região anomérica.	135
Tabela 21: Lista dos 15 metabólitos mais prováveis do endometaboloma (MExp_2) ordenados pelos <i>scores</i> referentes unicamente ao <i>match</i> com picos localizados na região alifática.	137

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-PAExp	Função de modelo não linear com 3 parâmetros, assintótica e exponencial
AD_SPCMN	<i>Specmine AlgaeDatabase</i>
AD_SPCMNM	<i>Specmine's Database for Algae Metabolites</i>
AD_SPCMNS	<i>Specmine's Database for ¹H-NMR spectra of Algae Metabolites</i>
ANOVA	Análise de variância
BAF	Fator de bioacumulação
BLYES	<i>Bioluminescent yeast estrogen assay</i>
BMRB	<i>BioMagResBank</i>
Bq	Bequerel (unidade de medida comumente utilizada em estudos com radiofármacos)
CAT	Catalase
ChEBI	<i>Chemical Entities of Biological Interest</i>
COX	Ciclooxigenase
CRAN	Repositório CRAN
E1	Estrona
E2	17 β -Estradiol
E3	Estriol
EC50	Valores da concentração efetiva de inibição em 50% do crescimento de algas
EDCs	Compostos disruptores endócrinos (<i>Endocrine disruptor compounds</i>)
EE2	17 α -Ethinilestradiol
EH	Extratos hidroalcoólicos
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>enzyme-linked immunosorbent assays</i>)
ETA	Estação de tratamento de água
ETEs	Estações de tratamento de esgotos
GPX	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reductase
GSI	Índice gonadossomático (<i>Gonadal somatic index</i>)
HA	Análise hierárquica
HC	Hidrocarbonetos

HC5	Valores da concentração efetiva de inibição do crescimento de algas em 5%
HIS	Índice hepatossomático (<i>Hepatosomatic index</i>)
HMDB	<i>Human Metabolome Database</i>
HPLC	Cromatografia de alta eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
Kegg	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LAFIC	Laboratório de Ficologia
LC-MS	Espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida de alta eficiência
LCM	Laboratório de Camarões Marinhos
LMBV	Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal
LN BIO	Laboratório Nacional de Biociências
LOD	Limite de detecção (<i>limit of detection</i>)
LOEC	Concentração mais baixa de efeito observado (<i>lowest observed effect</i>)
LOQ	Limite de quantificação (<i>limit of quantification</i>)
LPO	Peroxidação de lipídios
MDA	Malondialdeído
MMCD	<i>Madison Metabolomics Consortium Database</i>
MUFAs	Ácidos graxos monoinsaturados
NMR	Ressonância magnética nuclear (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NOEC	Concentrações de não efeito observado (<i>no observed effect concentrations</i>)
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (Solução tampão fosfato)
PCA	Análise de componentes principais (<i>Principal Components Analysis</i>)
PhACs	Compostos farmacêuticos ativos (<i>Pharmaceutically Active Compounds</i>)
PMC	<i>PubMed Central</i>
PNEC	Concentração de não-efeito (<i>predicted-no-effect concentration</i>)
POD	Peroxidase
PPCPs	Produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais (<i>Pharmaceuticals and personal care products</i>)
PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados
ROS	Espécies reativas de oxigênio

SDBS	<i>Spectral Database System for Organic Compounds</i>
SFAs	Ácidos graxos saturados
SOD	Superóxido dismutase
SPE	Extração de fase sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
STP	Sistema de tratamento de efluentes (<i>sewage treatment plants</i>)
SWMD	<i>Seaweed metabolite database</i>
<i>t</i> -teste	Teste <i>t</i> de Student
TBTO	Óxido de tributilestanho
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra performance (<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>)
VTG	Vitelogenina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO Geral.....	23
1.1	Hipótese do trabalho	24
1.2	OBJETIVOS	24
1.2.1	Objetivo Geral.....	24
1.2.2	Objetivos Específicos	24
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1	Introdução de estrógenos em sistemas aquáticos naturais	27
2.1.1	Influência das características físico-químicas dos estrógenos sobre a eficiência das ETEs na remoção destes compostos e a sua persistência no ambiente aquático.....	30
2.1.2	O sistema de esgotos domésticos no Brasil	34
2.2	17 α -etinilestradiol em ambientes naturais.....	36
2.3	17 α -etinilestradiol e seus efeitos na biota aquática	37
2.3.1	Organismos fotossintetizantes e poluentes estrógenos no ambiente aquático	39
2.3.2	Potencial da macroalga <i>Ulva</i> spp. como modelo biomonitor de contaminantes no ambiente aquático	48
3	METODOLOGIA GERAL	51
3.1	Implantação dos cultivos	51
3.2	Aclimação das algas pré-experimento e estimativa de peso seco.....	53
4	Capítulo I – Identificação do estrógeno 17α-Etinilestradiol em ambientes costeiros	54
4.1	INTRODUÇÃO	54
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	59
4.2.1	Amostras de água.....	59
4.2.2	Amostras algais	60
4.2.3	Parâmetros ambientais.....	60

4.2.4	Concentração do analito em amostras de água.....	61
4.2.5	Identificação do analito na biomassa algal (separação em duas fases).....	62
4.2.6	Fator de concentração	63
4.2.7	Quantificação de etinilestradiol por ensaio imuno-enzimático (ELISA).....	63
4.2.7.1	<i>Curva padrão para quantificação de EE2 nas amostras</i>	<i>64</i>
4.3	Resultados.....	65
4.3.1	Quantificação/deteção do EE2 nas amostras ambientais	66
4.4	DISCUSSÃO	68
4.4.1	Ocorrência de EE2 em amostras de água de ambientes costeiros.....	69
4.4.1.1	<i>EE2 na foz dos rios Capivari, Brás, Riozinho do Campeche e Sangradouro</i>	<i>69</i>
4.4.1.2	<i>Ausência do EE2 em ambiente marinho (praias de Canasvieiras e Ingleses)</i>	<i>73</i>
4.4.1.3	<i>EE2 em ambientes lacustres (Lagoa do Peri e Lagoa da Conceição)</i>	<i>74</i>
4.4.1.4	<i>Correlação dos resultados com fatores ambientais</i>	<i>76</i>
4.4.2	Análise do EE2 em tecidos algais	77
4.5	CONCLUSÃO	79
5	Capítulo II – <i>Ulva lactuca</i> exposta ao EE2	81
5.1	INTRODUÇÃO	81
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	82
5.2.1	Amostragem e extração	83
5.2.2	Ferramentas quimiométricas.....	84
5.2.3	Análises estatísticas.....	85
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	86
5.3.1	Análise comparativa dos perfis espectrais de varredura UV-visível	86
5.3.1.1	<i>Fingerprints</i>	<i>89</i>
5.3.2	Carotenoides totais e absorbâncias máximas para clorofilas a e b.....	90
5.3.3	Identificação e quantificação de carotenoides por cromatografia líquida (HPLC) e espectrometria de massas (LC-MS)	93

5.3.4	Comparação entre as concentrações dos compostos carotenoidicos apontados nas análises via UHPLC	97
5.3.4.1	<i>Compostos majoritários</i>	97
5.3.4.2	<i>Compostos minoritários</i>	102
5.4	Conclusão	102
6	Capítulo III – Espectroscopia de ¹H-NMR e ferramentas de bioinformática.....	103
6.1	Introdução	103
6.1.1	O uso de macroalgas como bioindicadores.....	104
6.1.2	Automação das análises de dados de ¹H-RMN	105
6.2	METODOLOGIA.....	107
6.2.1	Modelo experimental 1 (MExp_1: EE2, 1 mg/L, 48h).....	107
6.2.2	Modelo experimental 2 (MExp_2: EE2, 100 – 10.000 ng/L, 144h).....	108
6.2.3	Amostragem e extração para análise do endometaboloma.....	109
6.2.4	Amostragem e extração para análise do exometaboloma	110
6.2.5	Aquisição de espectros ¹H RMN de amostras biológicas	111
6.2.6	Aquisição de espectros ¹H RMN de compostos padrão em diferentes solventes	111
6.2.7	Processamento dos espectros ¹H-RMN.....	112
6.2.7.1	<i>Processamento MExp_1</i>	112
6.2.7.2	<i>Processamento MExp_2 e padrões de metabólidos</i>	113
6.2.8	Processamento dos espectros ¹H-RMN e análises multivariadas.....	114
6.2.9	Identificação de metabólitos	116
6.2.10	Construção do banco de espectros ¹H-RMN de metabólitos algais	117
6.2.10.1	<i>Compilação de metabólitos referenciados para algas</i>	118
6.2.10.2	<i>Identificação dos metabólitos</i>	120
6.2.10.3	<i>Coleção automatizada de espectros ¹H-RMN</i>	121

6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	121
6.3.1	Construção do <i>Specmine AlgaeDatabase</i>	121
6.3.1.1	<i>Coleção de metabólitos – text mining automático vs manual</i>	123
6.3.1.2	<i>Specmine AlgaeDatabase (AD_SPCMN)</i>	123
6.3.1.3	<i>Deslocamento químico diferenciado para diferentes solventes</i>	127
6.3.1.4	<i>Definição dos parâmetros para otimização do algoritmo do specmine para a identificação de metabólitos.....</i>	131
6.3.1.5	<i>Compostos identificados no endometaboloma</i>	132
6.3.2	Identificação do EE2 (MExp_1)	140
6.3.3	Análises de agrupamento hierárquico: MExp_1 (EE2, 1 mg/L, 48h).....	145
6.3.3.1	<i>Degradação do EE2 no exometaboloma</i>	146
6.3.3.2	<i>Alteração metabólica do exometaboloma</i>	147
6.3.4	Análise de agrupamento hierárquico – Mexp_2 (EE2, 100 – 10.000 ng/L, 144h) 149	
6.4	Conclusão	151
7	CONCLUSÃO geral	153
	REFERÊNCIAS.....	155
	ANEXO A – Glossário de indicadores operacionais de água e esgotos	186
	ANEXO B – Efeitos do EE2 em organismos aquáticos	188
	ANEXO C – Concentração de compostos estrógenos em diversos países e matrizes.....	194

1 INTRODUÇÃO GERAL

Nas últimas décadas, o estrógeno 17α -etinilestradiol (EE2) tem sido reportado como um importante xenobiótico em ambientes naturais aquáticos. Como principal composto presente em contraceptivos orais desde a década de 60 (DIAS et al., 2018), o consumo deste hormônio artificial foi rapidamente disseminado e hoje encontra-se presente em compartimentos naturais variados em muitos países, podendo ser encontrado inclusive em reservatórios, lençóis freáticos e em águas consideradas potáveis após tratamento e distribuição para consumo humano (ADEEL et al., 2017). Os efeitos adversos observados em organismos aquáticos expostos ao EE2 e a possibilidade de bioacumulação deste composto em níveis tróficos superiores (ARIS; SHAMSUDDIN; PRAVEENA, 2014) são motivos de grande preocupação, ainda mais quando observado o alto potencial disruptor endócrino que este composto apresenta mesmo em concentrações inferiores a 1ng/L (CALDWELL et al., 2008).

Como definição, um disruptor endócrino é uma substância ou uma mistura exógena capaz de alterar funções do sistema endócrino e potencialmente provocar efeitos adversos à saúde em um organismo, em sua progênie ou (sub) populações (WHO/PCS/EDC, 2002). Como tal, é compreensível que a disponibilidade de pesquisas que buscam entender os riscos dessas substâncias no ambiente e sustentar medidas de regulamentação destes compostos, sejam em sua maioria voltados para a saúde humana e para seus efeitos sobre a fauna silvestre, deixando organismos fotossintetizantes incógnitos na grande maioria das publicações que abordam a presença desses compostos no ambiente.

Este trabalho avalia as alterações metabólicas da macroalga *Ulva lactuca* (Chlorophyta) exposta ao estrógeno sintético 17α -etinilestradiol (EE2). Além disso, também investiga a presença deste hormônio em águas brasileiras e a possibilidade de que organismos carentes de receptores específicos ao hormônio em questão também possam ser considerados nas avaliações de risco desses micropoluentes, ampliando assim o escopo das discussões em andamento.

A primeira parte deste trabalho apresenta a revisão bibliográfica sobre as características do EE2 como poluente e fornece informações relevantes a serem consideradas nas discussões dos capítulos seguintes. Ainda nessa primeira parte uma metodologia geral é descrita, mas como as abordagens sobre o tema são bastante distintas entre os capítulos, optou-se por manter, além da metodologia geral, uma metodologia específica e sucinta para cada um dos capítulos que seguem. No primeiro, a presença do EE2 em Florianópolis foi identificada a

partir de ensaio imuno-enzimático (ELISA) e encontra-se descrita e discutida de forma comparativa ao que está publicado sobre a presença daquele composto no Brasil e em outros países. O segundo e o terceiro capítulos abordam as diferenças metabólicas encontradas na alga mediante exposição ao EE2. De forma sucinta, no segundo capítulo a discussão é apresentada considerando-se as diferenças encontradas nos perfis metabólicos via espectrofotometria UV-visível e HPLC, associadas a análises quimiométricas. No terceiro capítulo, uma abordagem mais voltada à bioinformática e a à utilização da técnica espectroscópica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN) é apresentada junto ao desenvolvimento de um banco de dados de metabólitos referenciado a espécies algais, utilizando-se a ^1H RMN como técnica analítica, que busca otimizar a identificação automatizada de compostos em matrizes complexas como extratos brutos de algas.

1.1 HIPÓTESE DO TRABALHO

O estrógeno 17α -etinilestradiol é internalizado pela alga *Ulva lactuca* e promove alterações metabólicas na espécie, sendo possível identificar as discrepâncias bioquímicas resultantes em seu endo- e exometaboloma e utilizá-las como indicadores da presença do hormônio na água.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Determinar o perfil metabólico de uma espécie de macroalga cosmopolita e de ocorrência frequente na costa brasileira (*Ulva lactuca*), exposta ao 17α -etinilestradiol.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Identificar se o hormônio encontra-se em águas costeiras em Florianópolis;
- Gerar perfis metabólicos dos extratos hidroalcoólicos (EH) da macroalga *Ulva lactuca*, via técnicas espectroscópicas nas regiões ultravioleta-visível (200-800nm);
- Determinar os perfis espectrais ^1H -RMN dos extratos algais em estudo;

- Subsidiar a eventual identificação de compostos candidatos a marcadores bioquímicos das amostras expostas ao xenobiótico;
- Quantificar os compostos carotenóidicos totais dos EH de *Ulva lactuca*, via espectrofotometria UV-Visível;
- Desenvolver, através de ferramentas de bioinformática, protocolos de análises do metaboloma de *Ulva lactuca* e de construção de modelos discriminantes e de classificação, baseados em $^1\text{H-RMN}$, possibilitando a geração de uma ferramenta que viabilize a determinação de alterações metabólicas derivadas da exposição ao xenobiótico em estudo;
- Definir se a espécie *Ulva lactuca* pode ser potencialmente utilizada como bioindicadora à eliciação por disruptores endócrinos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A contaminação de sistemas aquáticos por produtos farmacêuticos ou de cuidados pessoais rotineiramente consumidos (*Pharmaceuticals and personal care products* - PPCPs), tem levantado preocupações diversas relativas aos seus efeitos sobre os organismos de ambientes aquáticos e aos riscos vinculados ao possível consumo indireto dessas substâncias por humanos (RAHMAN KABIR; RAHMAN; RAHMAN, 2015).

Dentre os PPCPs, são discriminadas duas classes de contaminantes, os compostos farmacêuticos ativos (*Pharmaceutically Active Compounds*, PhACs) e os disruptores endócrinos (*Endocrine Disruptors Compounds* - EDCs). Até então esta discriminação não parece ter um limite muito bem definido e pode-se encontrar o mesmo composto rotulado em classes diferentes dependendo da publicação. Disruptores endócrinos em especial vem gerando debates interessantes entre agências governamentais de saúde pública (IPCS, 2002; EPA, 1998), pesquisadores acadêmicos (ZOELLER et al., 2012), conselhos nacionais de saúde e ciência (JUBERG, 2000) e representantes de classes médicas, farmacêuticas e empresariais (SLAMA et al., 2016; CEFIC, 2013; ZOELLER et al., 2012). Slama et al. (2016) e Juberg (2000) deixam claro o conflito de interesses entre esses grupos, a fragilidade de algumas pesquisas, bem como o esforço de certas classes representativas em descreditar pesquisas relacionadas à avaliação de riscos destes compostos. As discussões geradas são muitas e nem sempre objetivas, mas chamam a atenção para a necessidade de dados consistentes a partir de pesquisas reprodutíveis e com doses apropriadas a organismos de diferentes nichos e ambientes (JUBERG, 2000; ZOELLER et al., 2012). A disponibilidade de mais informações sobre a presença, os efeitos, ou não-efeitos, destes contaminantes na biota aquática permitirá melhor fundamentação para essas discussões e um panorama da real amplitude do problema.

O termo “emergente” muitas vezes atribuído aos EDCs não compreende somente os produtos químicos sintetizados nos últimos anos, mas também uma série de compostos orgânicos exógenos ou endógenos que somente agora vêm sendo detectados em diferentes compartimentos ambientais (SODRÉ et al., 2007). Hansen e Tickner (2013) chamam a atenção a cenários onde essa lacuna no conhecimento técnico-científico traz prejuízos à sociedade ao confundir a insuficiência da comprovação do dano como evidência de segurança, bem como ao predizer pseudo-catástrofes promovendo alarde social, induzindo potencial regulamentação excessiva e prejuízos econômicos. O melhor entendimento sobre a exposição e os riscos associados a estes compostos colabora com a fundamentação de possíveis regulamentações

mais consistentes, sem prejuízo infundado à indústria farmacêutica, mas principalmente, sem se dobrar às pressões do mercado que alega a falta de dados fiáveis e continua atuando sem os dispositivos legais necessários que garantam medidas que minimizem os riscos ao ambiente e a saúde humana.

2.1 INTRODUÇÃO DE ESTRÓGENOS EM SISTEMAS AQUÁTICOS NATURAIS

Tanto humanos como animais produzem e excretam naturalmente esteroides hormonais. As altas cargas destes compostos proveniente de produções pecuárias são consideradas importantes fontes de contaminação de águas superficiais e subterrâneas, a partir por exemplo, do despejo irregular de águas residuais, ou do escoamento superficial de áreas agrícolas que utilizam esterco como fertilizantes, entre outros (ARIS; SHAMSUDDIN; PRAVEENA, 2014; YING; KOOKANA; RU, 2002). A concentração e o tipo dos estrógenos naturais excretado por animais depende da espécie animal, gênero, idade, ciclo circadiano e estado reprodutivo (COMBALBERT; HERNANDEZ-RAQUET, 2010), de forma que cada produção animal gera diferentes proporções de estrógenos naturais, ou mesmo artificiais quando utilizadas drogas esteroidais de uso veterinário para o controle de distúrbios reprodutivos e/ou indução de abortos (YING; KOOKANA; RU, 2002). Lange e colaboradores (2002) estimaram a excreção diária total para estrogênios em produções animais com variações de 23-25 μg para ovinos, 45-540 μg para a produções de gado e 120-2.300 μg para a produções suínas.

Enquanto a excreção pecuária é apontada como a mais importante fonte contaminante de ambientes hídricos por estrona (E1), estradiol (E2) e estriol (E3), o amplo uso de contraceptivos orais por mulheres, transforma a excreção humana no principal veículo para a introdução do estrógeno sintético 17α -etinilestradiol (EE2) no ambiente (ADEEL et al., 2017; YING; KOOKANA, 2003), sendo este último composto mais estável e com maior potencial estrogênico quando comparado ao seu análogo natural E2 e aos demais estrógenos (E1 e E3) (

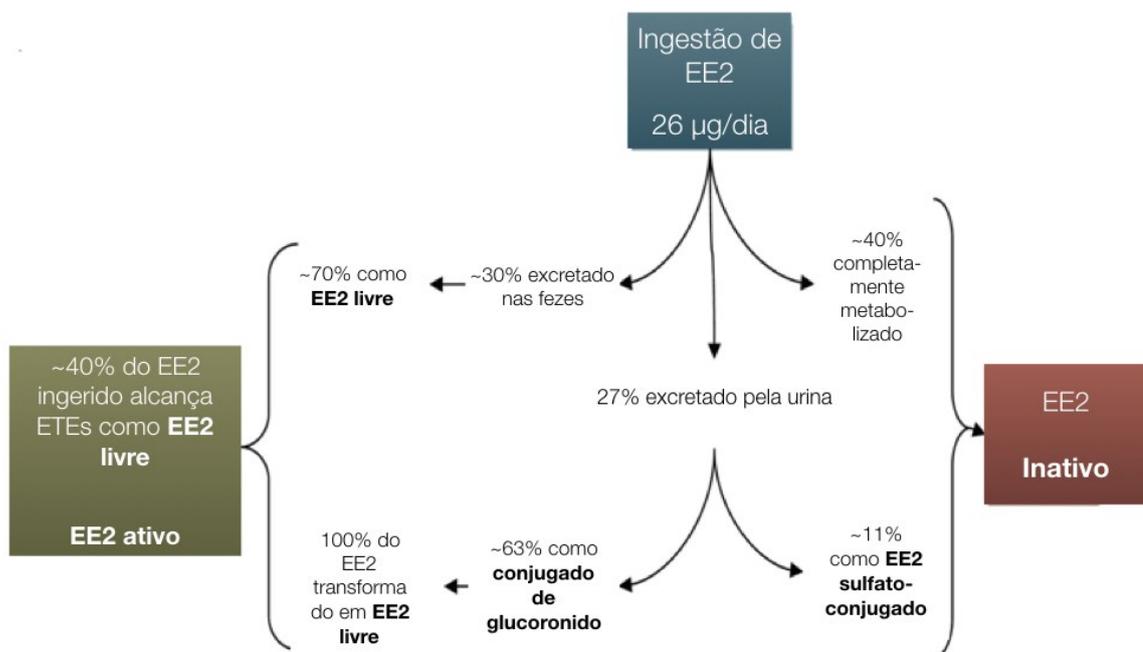
A “pílula da oportunidade” foi apresentada aos profissionais de farmácia na década de 60 como um produto que geraria lucro e prestígio no campo científico, clínico-terapêutico e político (DIAS et al., 2018). Neste período, a chamada “revolução sexual” surgiu entrelaçada a discussões antes caladas sobre planejamento familiar e às preocupações com a explosão demográfica (JOBILING; OWEN, 2013). A combinação do marketing por trás das pílulas e os eventos sociais e políticos à época promoveram a ampla adesão ao uso do contraceptivo e

deixaram uma herança de dimensões ainda desconhecidas no âmbito ambiental e na saúde pública. As primeiras formulações lançadas no mercado combinavam altas doses de estrógenos e progesterona. Desde o seu lançamento no mercado há mais de 50 anos, surgiram inúmeras versões combinadas de estrógenos e progestinas artificiais buscando a diminuição dos riscos à saúde e efeitos colaterais relacionados ao uso do contraceptivo. (LIU et al., 2011), sendo que o componente estrógeno das últimas gerações da pílula utilizam concentrações bem menores que sua versão original. De acordo com Dhont (2010), a primeira composição liberada à comercialização (Enovid®) trazia o mestranol como componente estrógeno à concentração de 75-150 μg por drágea, sendo subsequentemente substituído pelo etinilestradiol (EE2, 50 μg por drágea) em praticamente todas as composições. A maior estabilidade deste à degradação pelo fígado otimizou a administração via oral dos contraceptivos. No entanto, menos de 10 anos após o lançamento dos contraceptivos orais, efeitos colaterais como o tromboembolismo durante a gestação e efeitos cardiovasculares (i.e. hipertensão), dentre outros, provocaram a formulação de novas combinações com progestinas alternativas e concentrações gradualmente reduzidas de EE2 de 50 a 30, 20, e até 15 μg por drágea (DHONT, 2010). No Brasil são atualmente comercializadas e distribuídas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) contraceptivos orais com composições que variam de 15 a 30 μg de EE2 por drágea (dose diária), sendo a administração destes prescrita a mulheres desde a adolescência a fase adulta por motivos variados além da contracepção (i.e., tratamento de acne vulgaris, distúrbios menstruais, síndrome de ovários policísticos, amenorréia associada a hiperprolactinemia ou disfunção hipotalâmica, dor pélvica – incluindo dismenorreia secundária, diminuição dos efeitos da tensão pré-menstrual e endometriose) (GOMES et al., 2011; KAUNITZ, 1999) O composto EE2 também pode ser prescrito em casos de tratamento hormonal para a redução dos efeitos da menopausa (10 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de EE2), apesar de hormônios naturais já estarem sendo mais comumente utilizados para este tipo de terapia (WEBB et al., 2003).

Estima-se que pouco mais de 40% do total do EE2 ingerido por humanos seja metabolizado, sendo o restante excretado na forma de urina ou fezes (JOHNSON; WILLIAMS, 2004). A estimativa de excreção de Johnson e Williams (2004) considerou a ingestão de 35 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de EE2, concentração que encontra-se dentro do recomendado pelo manual britânico nacional de formulações (20-40 $\mu\text{g}/\text{dia}$), sendo que formulações padrão variam de 30 a 35 $\mu\text{g}/\text{dia}$ (JOHNSON; WILLIAMS, 2004 apud BNF 46, 2004). Como a ingestão de contraceptivos dá-se ao longo de 3 das 4 semanas/mês, na Figura 1 a estimativa do que seria ingerido por dia inicia-se com a média de 26 μg . Neste cálculo, os autores desconsideraram as

concentrações diárias que seriam ingeridas por meio de drogas para o tratamento de reposição hormonal, uma vez que estas já foram amplamente substituídas por produtos contendo estrógenos naturais ao invés do EE2 (JOHNSON; WILLIAMS, 2004 apud BNF 46, 2004). Assim, conforme o modelo sugerido, o excedente não metabolizado é diariamente excretado (i) via urina, como conjugados de sulfato de EE2 ou glucuronido solúvel em água (~ 27% do EE2 ingerido), (ii) ou junto às fezes, em sua maioria na forma livre (~ 30% do EE2 ingerido) (ARIS; SHAMSUDDIN; PRAVEENA, 2014; JOBLING; OWEN, 2013; WISE; O'BRIEN; WOODRUFF, 2011).

Figura 1: Estimativa da excreção de EE2. Todos os valores mostrados são aproximados e o número resultante não equivale a 100% do original ingerido de EE2.



Fonte: Autor (traduzido e adaptado de Wise, 2011; e Johnson e Williams, 2004).

Johnson e Williams (2004) sugerem que estrógenos conjugados, sulfato e glucuronídeo, excretados da bÍlis são amplamente desconjugados pela flora intestinal natural ainda antes da excreção do intestino e assumiram no modelo apresentado (Figura 1) que a totalidade de estrógenos excretados via fezes estariam em sua forma livre e biologicamente ativa.

Alguns autores defendem que a excreção na forma conjugada, por meio da urina possa ser bem maior (KOH et al., 2008). No entanto, ainda que a proporção do EE2 conjugado em

relação ao EE2 em sua forma livre não seja maior, ou tão díspar, resultados sobre a quantificação do hormônio no efluente apontam concentrações da forma livre muito maiores que a conjugada, como o observado em estações de tratamento francesas onde a fração de EE2 livre quantificada (2,6 ng/L) chegava em média a 96% da concentração total (2,7 ng/L) deste hormônio em amostras de efluentes (GABET-GIRAUD et al., 2010). Isso não necessariamente reflete a proporção entre frações livre ou conjugada excretadas, mas confirma a inclinação de frações conjugadas (glucoronidos e sulfatos) voltarem à sua forma livre mediante ação enzimática bacteriana capaz de desconjugar o EE2, deixando-o em uma forma mais estável, e consequentemente, persistente (KOH et al., 2008). Conforme revisão de Johnson e Williams (2004), a composição dos compostos conjugados também interfere na velocidade de transformação, uma vez que os dados revistos sobre a degradação de estrógenos naturais indicam que os sulfato conjugados são mais persistentes no sistema de esgotos que conjugados de glucoronideo.

Uma vez na estação de tratamento de esgotos (ETE), a velocidade em desconjugar e transformar compostos estrógenos dependerá do sistema utilizado, da concentração e eficiência da microbiota presente e do tempo de retenção do efluente na etapa biológica onde a clivagem de conjugados tende a acontecer (TERNES et al., 1999). A proporção final entre as frações livres e conjugadas liberadas no ambiente importa ao considerarmos que a fração ativa biologicamente é justamente a fração livre e mais estável (Tabela 1). Assim, quanto maior a proporção desta última fração, maior o potencial disruptor endócrino sobre os organismos expostos. Considerando o exposto até então, se a eficiência de remoção desses compostos pelo sistema de tratamento adotado não for efetiva em reduzir pelo menos 50% da concentração total de estrógenos no influente, existe uma grande chance de que o efluente liberado no ambiente apresente potencial estrogênico igual, ou mesmo maior que o influente (COMBALBERT; HERNANDEZ-RAQUET, 2010).

2.1.1 Influência das características físico-químicas dos estrógenos sobre a eficiência das ETEs na remoção destes compostos e a sua persistência no ambiente aquático.

Como abordado acima, alguns estrógenos esteroidais podem permanecer no efluente mesmo após o tratamento nas ETEs sendo consequentemente liberados no ambiente (AURIOL et al., 2006). Em revisão, Aris; Shamsuddin; e Praveena (2014) observaram que certos

disruptores endócrinos são eficientemente removidos e degradados no sistema de tratamento convencional projetados para o tratamento comum dos efluentes, mas que compostos modificados como o EE2 tendem a permanecer inalterados ao longo desses processos. Os autores associaram a maior dificuldade na remoção deste composto às suas características físico-químicas que resultam em sua estabilidade, destacando sua baixa solubilidade e coeficiente água-octanol (K_{ow} ; Tabela 1) que indicam a natureza hidrofóbica do composto e sua tendência à adsorção a partículas em suspensão que se depositam eventualmente junto ao sedimento (AURIOL et al., 2006).

Tabela 1: Propriedades físico-químicas dos estrógenos livres e conjugados.

	Peso Molecular (g/mol)	Solubilidade em água (mg/L a 20 °C)	Log K_{ow}	Pressão de vapor (mmHg)	Atividade estrogênica relativa
Estrógenos livres					
Estrona (E1)	270,37	12,40 – 13,00	3,13 – 3,43	2.3×10^{-10}	2,54
17 β -Estradiol (E2)	272,39	12,96 – 13,00	3,10 – 4,01	2.3×10^{-10}	100
Estriol (E3)	288,40	13	2,81	$6,7 \times 10^{-15}$	17,6
17 α -Etinilestradiol (EE2)	296,40	3,80 – 4,80	3,67 – 4,15	$4,5 \times 10^{-11}$	246
Estrógenos conjugados					
β -E2 3-sulfato	352,40	3,6	2,9	n.d.	2,6E-2
β -E2 3- β -D-glucuronido	448,40	347	1,46	n.d.	2,4E-2
E1-sulfato	350,40	5,9	0,29	n.d.	5E-3
E1- β -D-glucuronido	446,40	303	1,9	n.d.	<1E-3

Fonte: Compilado a partir das revisões de COMBALBERT; HERNANDEZ-RAQUET, 2010; MES; ZEEMAN; LETTINGA, 2005; LAI; SCRIMSHAW; LESTER, 2002.

n.d. – dado não disponível

Um tratamento de efluentes urbanos clássico é normalmente composto de (i) um tratamento preliminar para a retirada de objetos maiores (e.g., gradeamento e desarenação); (ii) um tratamento primário (físico ou químico) para a separação das frações líquidas e sólidos orgânicos, por decantação ou flotação; seguido do (iii) tratamento secundário (biológico) com lodo ativado da fração líquida do esgoto que pode ser feita em condições aeróbicas, anóxicas

e/ou anaeróbicas, para remoção de carbono, nitrogênio e fósforo (AURIOL et al., 2006; COMBALBERT; HERNANDEZ-RAQUET, 2010).

Combalbert e Hernandez-Raquet (2010) compilaram os resultados da remoção de estrógenos livres descritos para diversas ETEs em diversos países e encontraram grandes diferenças entre os valores de concentrações hormonais residuais em efluentes secundários, mesmo entre estações que utilizavam o mesmo sistema de tratamento. Como exemplo apresentado pelos autores, a remoção do EE2 pelas ETEs que utilizaram uma lagoa facultativa e duas lagoas de maturação variou de 29,7% a 100%. Além das características próprias do sistema de tratamento adotado (etapas de tratamento, tempo de retenção em cada etapa, tipo de microbiota quando utilizada, entre outros) a degradação e a eficiência de remoção do EE2 dependem também da temperatura, quer em função da sazonalidade ou induzida pela própria atividade microbiana (COMBALBERT; HERNANDEZ-RAQUET, 2010).

A presença do oxigênio também afeta a eficiência de remoção de estrógenos. Sistemas aeróbicos, por exemplo, tendem a degradar esses compostos de forma muito mais rápida que sistemas anóxicos (Tabela 2), no entanto, Ying e colaboradores (2008) observaram que para o EE2, mesmo em situações aeróbicas a velocidade de degradação foi muito menor que para os demais EDCs testados. Em microcosmo de efluentes aeróbicos foram estimados tempos de meia vida de 1,5 e 15 dias para E2 e EE2, respectivamente, enquanto que em condição anaeróbica esse tempo de meia-vida aumenta consideravelmente para 8,7 dias para o E2, enquanto o EE2 apresentou pouca ou nenhuma degradação observada ao longo de 70 dias (YING et al., 2008). Já no microcosmo aquífero, ambiente com menores teores de nitrogênio e fósforo, a velocidade de degradação do EE2 foi muito menor mesmo em ambientes aeróbicos (~81 dias), enquanto que para o E2 (2 dias) não foram observadas grandes alterações em relação à velocidade de degradação observada no microcosmo de efluentes (1,5 dias). Por este motivo, foi inferido pelos autores, que a degradação do composto artificial requer um processo co-metabólico e ambientes com maior concentração de nutrientes em efluentes favoreceriam a atividade biológica necessária (YING et al., 2008; YING; KOOKANA, 2003).

Vale salientar, que processos como desconjugar, degradar ou biotransformar estrógenos naturais ou sintéticos não são exclusivos aos processos biológicos em estações de tratamento de efluentes e pode ocorrer também em ambientes naturais, quando o excedente do hormônio não metabolizado presente na urina ou fezes é descartado irregularmente direto no ambiente ou quando as ETEs não são eficientes na remoção desses compostos. Em diversos ambientes aquáticos naturais também é relatada a maior persistência do EE2 em relação aos

demais EDCs, sejam estes naturais ou não (JÜRGENS et al., 2002; YING; KOOKANA, 2003; YING; KOOKANA; DILLON, 2003). A estrutura química desse composto de natureza hidrofóbica apresenta anéis condensados que o tornam mais resistente a ação de aparatos enzimáticos de micro-organismos (Figura 2) (YING et al., 2008).

Tabela 2: Tempo de meia-vida (dias) calculada para o 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2) em ambientes sob condições aeróbicas e anaeróbicas.

Ambiente	Meia-vida (dias)				Referência
	Aeróbico		Anaeróbico		
	E2	EE2	E2	EE2	
Efluentes	1,5	15	8,7	ND, >70d	Ying et al. (2008)
Rio Thames	1,2	17			Jürgens et al. (2002)
Água de reservatório	0,24	26	8,4	ND, >70d	Ying et al. (2008)
Água de aquífero (<i>groundwater</i>)	2	~ 81	~ 107	ND, >70d	Ying; Kookna; Dilon (2003)
Sedimento marinho	4,4	≥ 20	67	ND, >70d	Ying ; Kooana (2003b)
Água do estuário Acushnet ¹	n.d.	<1,5	n.d.	n.d.	Zuo; Zhan; Deng (2006)
Sedimento de rio	0,11		0,37-0,66		Jürgens et al. (2002)

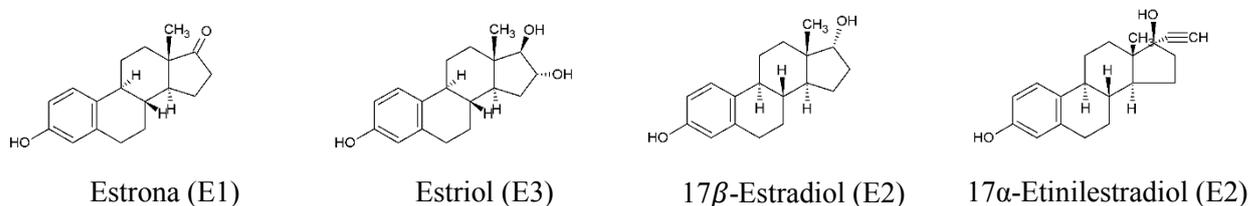
Fonte: dados compilados pela autora a partir das referências listadas na tabela.

ND = autores não detectaram degradação suficiente durante o período de experimento (entre parêntesis) que permitisse a projeção de uma taxa de degradação neste ambiente; n.d. = dado não disponível; ¹ Sob radiação de 300nm, sem aeração.

Quando considerados os ambientes costeiros, a salinidade também passa a ser um fator importante, aumentando a capacidade de adsorção dos estrógenos a sedimentos ou à matéria orgânica em suspensão (GIMILIANI; FONTES; ABESSA, 2016). Desta forma, esses compostos tendem a se acumular no substrato inconsolidado, reduzindo as concentrações na fase aquosa (GIMILIANI; FONTES; ABESSA, 2016; LAI et al., 2000) e a velocidade de degradação dos compostos adsorvidos. Ying e Kookana (2003) encontraram resultados semelhantes para a degradação aeróbica do E2 e EE2 em água do mar nos primeiros 28 dias após o início tratamento, com diminuição de cerca de 20% da concentração inicial para ambos estrógenos. Após esse período, as taxas de degradação aumentam e se diferenciaram, alcançando 97% para o E2 e 92% para o EE2 em 42 dias após iniciado o ensaio. Tal discrepância na velocidade de degradação em relação aos primeiros 28 dias demonstra que os micro-organismos presentes na água do mar (coletada em Kilda Beach, Austrália) são capazes de

degradar estrógenos e outros EDCs, uma vez que se encontrem aclimatados a presença desses xenobióticos (YING; KOOKANA, 2003). Este período de aclimação parece desnecessário no sedimento marinho sob condições aeróbicas, aonde taxas de degradação bastante diferenciadas daqueles hormônios foram detectadas. Assim, apenas 4% da concentração inicial de E2 foi observada após 21 dias de tratamento, enquanto o dobro de tempo foi necessário para que um valor de 6% da concentração inicial de EE2 fosse alcançado (YING; KOOKANA, 2003).

Figura 2: Estrutura química de estrógenos esteroidais naturais (E1, E2, E3) e sintético (EE2).



Fonte: Autor (estruturas construídas na plataforma do ChemSketch - ACD/LAB), adaptado de Adeel e colaboradores, 2017.

2.1.2 O sistema de esgotos domésticos no Brasil

O Brasil possui vasto território com grande diversidade social, econômica e climática que influenciaram na instalação de diferentes configurações para o tratamento de esgotos espalhadas pelo país. O clima brasileiro favorece a utilização de sistemas biológicos e, de forma geral, o sistema de tratamento de efluentes (STP) mais tradicional envolve lagoas de estabilização isoladas, combinadas ou numa sequência de diferentes tipos de lagoas (SPERLING, 2016). Estes sistemas comumente atendem áreas com população de até 20 mil habitantes, e em áreas com diferentes faixas populacionais, são também incorporadas variantes do processo de lodo ativado, e mais recentemente, de reatores anaeróbicos de fluxo ascendente. Este último tornou-se um sistema determinante para o tratamento de águas residuais no Brasil, podendo ser acompanhado ou não de um estágio de pós-tratamento (e.g. filtros de gotejamento e lagoas de polimento; SPERLING, 2016).

De acordo com o último diagnóstico dos serviços de água e esgotos (SNIS, 2019), referente ao ano de 2017, apenas 52,4%, da totalidade da população brasileira possui acesso à rede coletora de esgotos (IN056, Tabela 3), no entanto, o índice em questão não considera a parcela da população não contemplada com a distribuição de água tratada (16,5% da população total). Considerando apenas o município de Florianópolis onde as coletas para este trabalho

foram realizadas, esse índice sobe para 62,98%. De forma positiva, a rede de esgotos da capital catarinense vem sendo paulatinamente ampliada nos últimos anos (CASAN, 2018), mas ainda não alcança a totalidade dos domicílios na região insular e como a ligação domiciliar à rede permanece a cargo dos proprietários da unidade domiciliar, mesmo tendo a rede concluída em sua região, muitos proprietários de imóveis continuam fazendo uso irregular da rede pluvial para o descarte de efluentes, ou descartando-os a céu aberto em diversos pontos da ilha. O programa “Floripa se liga na rede” da Prefeitura Municipal de Florianópolis, em parceria com a CASAN, vem fiscalizando e autuando diversas infrações relacionadas a irregularidades do sistema de esgoto sanitário, de forma que é esperado que o déficit mencionado diminua nos próximos anos (CASAN, 2014b; FLORIANÓPOLIS, 2019a, 2019b).

Tabela 3: Índices de atendimento com água e esgotos por macrorregião brasileira e no município de Florianópolis referente ao ano de 2017.

Macrorregião	Índice de atendimento com rede (%)				Índice de tratamento dos esgotos (%)	
	Água		Coleta de esgotos		Gerados	Coletados
	Total (IN ₀₅₅)	Urbano (IN ₀₂₃)	Total (IN ₀₅₆)	Urbano (IN ₀₂₄)	Total (IN ₀₄₆)	Total (IN ₀₁₆)
Norte	57,5	70,0	10,2	13,0	22,6	84,6
Nordeste	73,3	88,8	26,9	34,8	34,7	80,8
Centro-Oeste	90,1	98,1	53,9	59,5	52,0	92,6
Sudeste	91,3	95,9	78,6	83,2	50,4	67,3
Sul	89,7	98,4	43,9	50,6	44,9	93,3
Município de Florianópolis	100,0	100,0	63,0	65,5	46,3	100,0
Brasil	83,5	93,0	52,4	60,2	46,0	73,7

Fonte: SNIS, 2019.

IN₀₅₅ - Índice de atendimento total de água; IN₀₂₃ - Índice de atendimento urbano de água; IN₀₅₆ - Índice de atendimento total de esgoto referido aos municípios atendidos com água; IN₀₂₄ - Índice de atendimento urbano de esgoto referido aos municípios atendidos com água; IN₀₄₆ - Índice de esgoto tratado referido à água consumida; IN₀₁₆ - Índice de esgoto urbano referido à água consumida. Nota: Detalhes sobre os cálculos referentes aos índices no Anexo A.

Pessoa e colaboradores (2014) estudaram a eficiência de cinco sistemas de tratamento de efluentes no Estado do Ceará (Brasil) e encontraram grande variação na ocorrência e na concentração de estrógenos entre amostras de influentes e efluentes em concordância ao observado por outros autores em outros estados no Brasil (SPERLING, 2016) e em outros

países (COMBALBERT; HERNANDEZ-RAQUET, 2010). Nas STPs cearenses, a carga hormonal inicial nos influentes não foi a mesma entre as estações e os autores apontaram uma tendência de menor taxa de remoção em estações que receberam maiores concentrações de esgoto bruto. Essa concentração de estrógenos no esgoto bruto pode variar de acordo com as características da população, tais como, tamanho, sexo, distribuição de classes de idade e práticas contraceptivas, por exemplo (COMBALBERT; HERNANDEZ-RAQUET, 2010). Assim, em áreas mais urbanizadas, além da maior probabilidade de apresentarem concentrações superiores de EE2 no influente, a eficiência relativa de remoção do xenobiótico pode ser reduzida. Este cenário provavelmente ocorre em Florianópolis, onde no verão o número de habitantes na ilha aumenta consideravelmente e as ETEs naturalmente recebem volumes muito maiores de efluentes.

2.2 17 α -ETINILESTRADIOL EM AMBIENTES NATURAIS

O crescente número de publicações sobre a presença de EE2 em ambientes naturais chama a atenção para o fato de que esta é uma realidade preocupante relatada em muitos países, mesmo naqueles considerados desenvolvidos (BERTIN; INOSTROZA; QUIÑONES, 2009; LAI; SCRIMSHAW; LESTER, 2002b). Ainda assim, observa-se a alienação da população sobre a presença e os riscos desses poluentes sobre os diversos componentes da biota aquática e da saúde humana (JOBBLING; OWEN, 2013). Medidas de monitoramento e controle têm sido adotadas em alguns países da União Européia e Estados Unidos, mas ainda sem limites definidos para água potável (CUNHA et al., 2016). Na União Européia, o EE2 entrou na lista de “substâncias prioritárias” para o monitoramento em 2012 e o limite de 0,035 ng/L de EE2 foi estipulado para corpos hídricos, no entanto, somente a partir de 2015 que a medida foi de fato regulamentada (JOBBLING; OWEN, 2013). A demora, segundo os autores, deve-se ao aumento de custos em remover concentrações muito baixas (partes por trilhão) do composto, um preço que os europeus se dispuseram a pagar mediante os riscos apresentados e estudos ecotoxicológicos. Nos Estados Unidos o EE2 ainda não apresenta limites de regulamentação para corpos hídricos, mas desde 2009, o estrógeno sintético entrou na lista de poluentes (CCL, *Contaminant Candidate List*) monitorada pelo programa *Unregulated Contaminant Monitoring* (UCM) que coleta dados sobre os poluentes suspeitos (CUNHA et al., 2016; USEPA, 2016). Além do EE2, outros compostos disruptores endócrinos, além de pesticidas, produtos farmacêuticos, toxinas biológicas entre outros, também foram incorporados à CCL como um

primeiro passo à regulamentação que pondera aspectos como efeitos sobre a saúde humana, ocorrência no meio hídrico e métodos analíticos (CUNHA et al., 2016). No Brasil, existem limites para alguns compostos com potencial disruptor endócrino (e.g. aldrin, DDT, heptacloro e bifenilas policloradas – PCBs) para corpos de água superficiais definidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), entretanto, as resoluções vigentes não incluem o estrogênio 17 α -etinilestradiol (CUNHA et al., 2016).

No meio acadêmico, a identificação do EE2 em ambientes aquáticos naturais e seus efeitos nos organismos expostos permanece como tema atual na agenda de diversas pesquisas (ADEEL et al., 2017; ARIS; SHAMSUDDIN; PRAVEENA, 2014; BARREIROS et al., 2016; URAIPONG et al., 2017). Embora diversos estudos de monitoramento e dos efeitos dessas substâncias tenham sido realizados em sistemas aquáticos naturais, a maior parte das referências está focada em águas superficiais de sistemas fluviais e áreas próximas à descargas de efluentes, com menor frequência de relatos ao ambiente costeiro (BARREIROS et al., 2016; LAI; SCRIMSHAW; LESTER, 2002b). Assim, dados sobre a persistência, tempo de residência e adsorção desses compostos, e em específico do EE2, em ambientes estuarinos e marinhos são limitados (ATKINSON; ATKINSON; TARRANT, 2003; GIMILIANI; FONTES; ABESSA, 2016). Além disto, métodos de dosagem daquele xenobiótico por vezes são pouco sensíveis, i.e. com altos valores de limite de detecção - LOD (MACHADO et al., 2016; MELO; BRITO, 2014; SODRÉ; LOCATELLI; JARDIM, 2010) não permitindo a sua correta mensuração, mesmo em amostras com altos teores de cafeína, um composto considerado relevante como marcador de efluentes urbanos.

Poucos trabalhos foram realizados quantificando EE2 em corpos d'água brasileiros. O extensivo trabalho de Machado e colaboradores (2016) se destaca pela expectativa criada ao analisarem água de torneira em 20 capitais brasileiras e águas de reservatórios em três delas. Todavia, o limite de detecção do método usado para EE2 foi de 8 ng/L, considerado alto para águas de reservatório ou água tratada. A distribuição de valores de concentrações de EE2 em águas brasileiras encontra-se descrita no capítulo 1.

2.3 17 α -ETINILESTRADIOL E SEUS EFEITOS NA BIOTA AQUÁTICA

Os efeitos nocivos da presença de estrógenos naturais ou sintéticos sobre a fauna aquática foram bastante explorados nas últimas décadas e, apesar de não serem letais na maioria dos casos, sabe-se que estes impactos podem ser permanentes e irreversíveis aos organismos

expostos e conseqüentemente a populações silvestres (JOBILING; OWEN, 2013). Por sua inerente importância ecológica e econômica, os peixes estão entre os organismos mais investigados no que concerne aos efeitos como disruptor endócrino do EE2 (CUNHA et al., 2016), mas outros organismos como poliquetas, anfípodes e bivalves também se destacam como bioindicadores deste poluente (MARANHO et al., 2014, 2015a; PETRIDIS; JHA; LANGSTON, 2009). Com base nos dados acumulados ao longo dos anos, a toxicidade direta dos compostos estrógenos à fauna silvestre encontra-se bem fundamentada mesmo em doses tão baixas como 1 ng/L (ADEEL et al., 2017; ARIS; SHAMSUDDIN; PRAVEENA, 2014), mas seus efeitos sobre comunidades florísticas ainda são pouco conhecidos.

Apesar dos benefícios à saúde pública, o amplo e contínuo uso do EE2, seja como método contraceptivo ou como controle dos sintomas da menopausa ou do hipogonadismo feminino, gera resíduos que vem sendo apontados como causadores de danos diversos à vida selvagem (JOBILING; OWEN, 2013; JOHNSON; WILLIAMS, 2004; SCHUG et al., 2016). De acordo com Colborn (1994), uma série de alterações na saúde humana e na fauna silvestre estariam relacionadas ao início da exposição humana aos contraceptivos. O autor sugere que os potenciais efeitos promovidos pelo EE2 excedem a saúde do indivíduo exposto, e que as gerações que descendem destes também poderiam(ão) sofrer alterações em função da exposição submetida por seus ascendentes. Entre os efeitos indiretos descritos, encontram-se as reduções na fertilidade e/ou na imunidade observada entre coortes.

Estrógenos naturais ou sintéticos exibem alta afinidade com receptores endócrinos, de forma que mesmo em concentrações muito baixas podem promover alterações endócrinas importantes em ampla gama de organismos silvestres (COMBALBERT; HERNANDEZ-RAQUET, 2010). Em publicação no ano de 2008, Caldwell recomendam uma concentração prevista sem efeito (*Predicted no Effect Concentration* – PNEC) de 0,35 ng/L do EE2 para toxicidade de organismos aquáticos, tendo a reprodução de peixes como o ponto mais sensível dentre os diversos estudos que consideravam concentrações de não efeito observado (*no observed effect concentrations* – NOECs). De acordo com os autores, os PNECs anteriores foram calculados considerando a letalidade mediante a exposição crônica deste composto em diversas espécies, chegando a valores de 1,6 mg/L (96h, LC50) para *rainbow trout* e 1,7 mg/L (96h, LC50) para *zebrafish*, por exemplo. No entanto, o que os mesmos autores pontuam é que hormônios sintéticos como o EE2 foram especificamente designados para evitar a função reprodutiva normal via receptores de estrogênio, e que é esperado que organismos que possuam os mesmos receptores, como é o caso de animais vertebrados, tenham suas funções reprodutivas

afetadas de forma severa muito antes da letalidade e com concentrações muito menores. Desta forma, os índices de PNEC sugerido por eles deriva da distribuição dos efeitos do EE2 sobre a reprodução de um total de 26 espécies resultando em uma concentração mediana na qual 5% das espécies testadas são afetadas (HC_{5,50}). A partir deste racional, outros estudos foram realizados considerando dados atualizados, novas espécies e/ou caracterização de diferentes riscos e efeitos ecológicos. Neste sentido, valores de PNEC foram estimados para a toxicidade crônica do EE2, variando de 0,5 ng/L a 0,035 ng/L (revisado por LAURENSEN et al., 2014).

As alterações relatadas em organismos expostos a estrógenos são diversas, e ultrapassam as questões reprodutivas, podendo promover alterações bioquímicas e histopatológicas (fígado, gônadas e rins), comportamentais e também nos processos de desenvolvimento (CUNHA et al., 2016). Como exemplo dessa desestabilização do sistema endócrino são ressaltadas à biota aquática a diminuição do tamanho e comprimento de peixes; feminilização e alteração de índices gonadossomáticos em peixes e moluscos; redução do número de ovos produzidos por geração (ou a não produção destes) em peixes; redução da produção de esperma, alteração de respostas subletais como peroxidação de lipídios (LPO); decréscimo de atividades enzimáticas (e.g., glutathione peroxidase – GPX, ciclooxigenase - COX); danos ao DNA em anfípodas, expressão da vitelogenina em peixes machos ou juvenis (mesmo sendo uma proteína predominante em fêmeas quando em período reprodutivo) e a superexpressão da mesma proteína em fêmeas (vide Anexo B para mais detalhes – ARIS; SHAMSUDDIN; PRAVEENA, 2014; FOLMAR et al., 2000; KIDD et al., 2007; MARANHO et al., 2015a, 2015b). Ainda que em concentrações na faixa de ng/L, a presença de estrógenos em sistemas fechados como lagos podem levar certas populações ao colapso, como observado para o peixe “fathead minnow” (*Pimephales promelas*) em ambiente lacustre, como resposta a concentrações de 5-6 ng/L de EE2 ao longo de sete anos (KIDD et al., 2014). Segundo os autores, espécies de ciclo de vida curto estariam mais suscetíveis à diminuição e potencial colapso quando expostas de maneira crônica ao micropolvente em questão. A significativa mortalidade de poliquetas *Hediste diversicolor* também foi observada após 14 dias de exposição a concentrações de 10 e a 100 ng/g em sedimentos (MARANHO et al., 2014).

2.3.1 Organismos fotossintetizantes e poluentes estrógenos no ambiente aquático

Como mencionado acima, abordagens que considerem a toxicidade e efeitos subletais sobre organismos fotossintetizantes, a capacidade e/ou mecanismo de bioacumulação ou

biotransformação em tecidos vegetais, e a utilização de alterações bioquímicas como marcadores da presença do xenobiótico ainda são pouco exploradas. Essa carência de informação limita o entendimento dos reais efeitos impostos aos organismos que se encontram na base da cadeia trófica. O entendimento desses efeitos é fundamental tanto para a segurança da saúde pública, como ecologicamente para a predição de possíveis eventos ecológicos impactantes (e.g. declínio ou aumento de dadas populações, bioacumulação do xenobiótico, toxicidade de subprodutos), e biotecnologicamente para a predição de biomarcadores e alterações no conteúdo de metabólitos economicamente interessantes, por exemplo.

Nos últimos anos, no entanto, ensaios *in vitro* com microalgas expostas a estrógenos foram publicados indicando o recente interesse por essa linha de pesquisa (ÁLVAREZ-MUÑOZ et al., 2015; BALINA et al., 2015; BELHAJ et al., 2017; DELLA GRECA et al., 2008; GE et al., 2009; LAI; SCRIMSHAW; LESTER, 2002a; MAES et al., 2014; MARANHO et al., 2015b; SHI et al., 2010; WANG et al., 2019). Na maioria dos casos, as abordagens empregadas avaliam a capacidade das algas em degradar EDCs, e seu potencial uso como bioremediadoras, e poucos consideraram seu metabolismo secundário ou quais as vias metabólicas ativadas para os resultados encontrados (Tabela 4). Em ensaios *in vitro*, Della Greca e colaboradores (2008) avaliaram a biotransformação do EE2 em onze espécies de microalgas, concluindo que sete não se mostraram efetivas. No entanto, dentre as espécies testadas, *Selenastrum capricornutum* foi capaz de biotransformar mais de 90% do EE2, quando utilizada a condição de máxima densidade celular da alga (640 mg/L, peso seco). Wang, Wong e Tam (2012) também expuseram diferentes espécies de microalgas (*S. capricornutum* e *Chlorella* sp.) aos estrógenos E2 e EE2 (100 µg/L de cada). Ambas mostraram-se tolerantes aos compostos exógenos, mas as respostas mediante ao estresse oxidativo foi diferenciado entre as espécies.

Neste contexto, as variações na absorção e acumulação de estrógenos por células algais observadas por Della Greca e colaboradores (2008) também podem estar relacionadas à fisiologia espécie-dependente e suas respostas antioxidantes à presença do xenobiótico (WANG; WONG; TAM, 2012). Wang, Wong e Tam (2012) observaram a indução da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e decréscimo do conteúdo do malondialdeído (MDA) na microalga *S. capricornutum*, mas não em *Chlorella* sp.. Já esta última alga apresentou aumento significativo no conteúdo de glutadiona (GSH), enquanto este índice não foi afetado na primeira (*S. capricornutum*) nos tratamentos com estrogênio.

Tabela 4: Efeitos do EE2 relatados em algas e plantas aquáticas, de acordo com literatura disponível no Portal Capes e artigos publicados em *open-access*.

Classificação (AlgaeBase)	Espécie (sinonímia)	Habitat (AlgaeBase)	Dose	Tempo de exposição	Variável/parâmetro analisada(o)	Efeitos	Referência
Phylum Bacillariophyta Class Bacillariophyceae Order Naviculales Family Naviculaceae	<i>Navicula salinicola</i> (<i>N. incerta</i>)	Diatomácea, ocorre ao longo da costa em águas salobras	0,001; 0,01; 0,1; 1; 4 e 10 mg/L EE2	96h	Biodegradação	Bioengraduação observada nas concentrações (mg/L) de 0.001 (31%), 0,01 (28%), 0,1 (27%), 1 (7%), 4 (5%).	Liu et al. (2010)
					Bioacúmulo	Bioacúmulo de 0,98%	
					Taxa de crescimento	Inibição do crescimento: EC50 = 3,21 mg/L; HC50 = 1,25 mg/L	
					Conteúdo celular	Diminuição dos conteúdos de clorofila (46,7%) e de proteínas totais (63,3%); aumento do teor de lipídios (101,1%)	
					Respostas antioxidantes	Aumento das atividades de SOD e GST (62,3% e 59,9%, respectivamente) e diminuição da atividade de POD (25,2%)	
Phylum Chlorophyta Class Chlorophyceae Order Chlamydomonadales Family Dunaliellaceae	<i>Dunaliella salina</i>	Nanofitoplancton - Espécie marinha / de água doce	10, 100 e 1000 ng/L EE2	11 dias	Inibição do crescimento	Inibição significativa do crescimento nos tratamentos com 100 ng/L (35%) e a 1000 ng/L (51,03%)	Belhaj et al. (2017)
					Conteúdo celular (metabólitos primários)	Redução dos teores de clorofilas a e b e aumento dos conteúdos de proteína total e carboidratos nos tratamentos com 100 e 1000 ng/L.	
					Conteúdo celular (metabólitos secundários)	Conteúdo de polifenóis, flavonoides e atividade antioxidante aumentados (ABTS) com o incremento de EE2	
					Respostas antioxidantes	Indução da atividade de SOD a 1000 ng/L (38%). Diminuição das atividades de CAT (25%) e GPx 25 (0,42%) em 1000 ng/L	Belhaj et al. (2017)

Classificação (AlgaeBase)	Espécie (sinonímia)	Habitat (AlgaeBase)	Dose	Tempo de exposição	Variável/parâmetro analisada(o)	Efeitos	Referência
					Ácidos graxos	Aumento de SFAs (de 36,18 a 50,46%) e MUFAs (de 11,04 a 31,44%). Diminuição de PUFAs.	
Phylum Chlorophyta Class Chlorophyceae Order Chlamydomonadales Family Haematococcaceae	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Espécie de água doce			Biotransformação	Até 85% do EE2 do meio removido. ½-vida EE2 = 14 dias Remoção de E2 e E1 também.	Wang et al. (2019)
Phylum Chlorophyta Class Chlorophyceae Order Sphaeropleales Family Scenedesmaceae	<i>Desmodesmus communis</i>	Espécie de água doce	10, 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000 ug/L	0, 24, 48 e 72 h	Atividade fotossintética (fluorescência) Crescimento	Redução da atividade fotossintética ($r^2 = 0,8642$) Inibição do crescimento com forte correlação com os teores de EE2 detectados ($r^2 = 0,8561$). EC50 = 80 ug/L. Concentrações > 1,300 ug/L capazes de interromper completamente a divisão celular e promover danos às células iniciais.	Balina et al. (2015)
	<i>Scenedesmus communis</i> (<i>Desmodesmus communis</i>)	Espécie de água doce	100 ug/L EE2	24, 48, 96 e 168 h	Biotransformação/bioconcentração	EE2 não foi detectado dentro das células de algas. Biotransformação não induzida. Conc. inicial: 160 mg/L (peso seco, alga)	Della Greca et al. (2008)
	<i>Scenedesmus quadricauda</i> (<i>Desmodesmus communis</i>)	Espécie de água doce	100 ug/L EE2	24, 48, 96 e 168 h	Biotransformação/bioconcentração	EE2 foi convertido a subprodutos (SP) SP5 (12%). EE2 não detectado dentro das células de algas.	Della Greca et al. (2008)

Classificação (AlgaeBase)	Espécie (sinonímia)	Habitat (AlgaeBase)	Dose	Tempo de exposição	Variável/parâmetro analisada(o)	Efeitos	Referência
	<i>Scenedesmus quadricauda</i> (<i>Desmodesmus communis</i>)				Biotransformação	Até 85% do EE2 do meio removido. ½-vida EE2 = 14 dias Remoção de E2 e E1 também.	Wang et al. (2019)
	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	Espécie de água doce	20 ug/L EE2	3h, 8h, 24h, 48h e 72h	Assimilação	23% assimilado nas primeiras 24h (145 Bq/mg * alga, peso seco), sem posterior assimilação até 72%	Maes et al. (2014)
			32 ug/L EE2	Exposição: 28h; eliminação: 3h, 8h, 24h, 48h e 72h	Eliminação	Remoção do EE2 na água em até 67% em 72h, com rápida eliminação em água limpa nas primeiras 13h e posterior queda.	
			27 ug/L 14C-EE2	48h e 72h	Biotransformação	EE2 transformado em dois subprodutos mais lipofílicos (EE2 monobrominado e EE2 dibrominado), sendo o EE2 brominado formado mais na fase escura. Na ausência de NaBr no meio de cultivo não houve biotransformação ½-vida EE2 = 14,3 h	
	<i>Scenedesmus obliquus</i> (<i>Tetradasmus obliquus</i>)	Espécie de água doce	100 ug/L EE2	24, 48, 96 e 168 h	Biotransformação/bioconcentração	EE2 não detectado nas células de algas. Biotransformação não induzida. Conc. inicial: 160 mg/L (peso seco, alga)	Della Greca et al. (2008)
	<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	n.a.	100 ug/L EE2	24, 48, 96 e 168 h	Biotransformação/bioconcentração	EE2 não detectado dentro das células de algas. Produtos de biotransformação detectados, mas não quantificados (teores < LOQ). Conc. inicial: 160 mg/L (peso seco, alga)	Della Greca et al. (2008)

Classificação (AlgaeBase)	Espécie (sinonímia)	Habitat (AlgaeBase)	Dose	Tempo de exposição	Variável/parâmetro analisada(o)	Efeitos	Referência
Phylum Chlorophyta Class Chlorophyceae Order Sphaeropleales Family Selenastraceae	<i>Selenastrum capricornutum</i> (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)	Espécie de água doce	100 ug/L EE2	24, 48, 96 e 168 h	Biotransformação/ bioconcentração	Biotransformação progressiva de até 92%. EE2 convertido a subprodutos (SP) SP2 (40%), SP3 (5%) e SP4 (5%). EE2 não detectado em células de algas. Conc. inicial: 160 mg/L (peso seco, alga)	Della Greca et al. (2008)
			200 ug/L de EE2; e 200 ug/L E2+EE2 (1:1)	7 dias	Atividade da esterase	Valores máximos observados no 2º dia, com posterior redução (dias 3 e 4)	Wang, Wong & Tam (2012)
					Fluorescência da clorofila a	Aumento do tamanho das células e da fluorescência da clorofila nos primeiros 2 dias.	
					Complexidade celular	Aumento da complexidade celular (síntese dos componentes celulares) nos primeiros 2 dias.	
					Nível de ROS	Indução de ROS nas células comparadas com o controle (dia 1) com máximos observados no dia 2. Ao longo do experimento houve diminuição dos níveis no dia 4 e que voltaram a aumentar no dia 7.	
					Respostas antioxidantes	Atividades enzimáticas (SOD, POD e GSH) associadas ao dano oxidativo não aumentadas pelos tratamentos com estrogênios (EE2 e E2+EE2). Conteúdo de MDA significativamente reduzido no tratamento com EE2.	

Classificação (AlgaeBase)	Espécie (sinonímia)	Habitat (AlgaeBase)	Dose	Tempo de exposição	Variável/parâmetro analisada(o)	Efeitos	Referência
			10 mg/L EE2+EE2 (1:1)	7 dias	Crescimento	Não afetado pela mistura de E2 e EE2 a 10 mg/L	Wang, Wong & Tam (2012)
			EE2+EE2 (1:1)	48h	Inibição do crescimento	EC50 =110,5 mg/L	
	<i>Selenastrum capricornutum</i> (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)	Espécie de água doce			Biotransformação	Pouca habilidade em remover o EE2 do meio de cultura. Após 35 dias potencial estrogênico no ensaio YES, teve redução de menos de 50%	Wang et al. (2019)
Phylum Chlorophyta Class Trebouxiophyceae Order Chlorellales Family Chlorellaceae	<i>Ankistrodesmus braunii</i>	Espécie de água doce	100 ug/L EE2	24, 48, 96 e 168 h	Biotransformação/ bioconcentração	EE2 convertido a subprodutos (SP) SP6 (25%). EE2 não detectado dentro das células de algas.	Della Greca et al. (2008)
	<i>Chlorella ellipsoidea</i> (<i>Chloroidium ellipsoideum</i>)	Espécie de água doce / terrestre	100 ug/L EE2	24, 48, 96 e 168 h	Biotransformação/ bioconcentração	EE2 não detectado dentro das células de algas. Biotransformação não induzida.	Della Greca et al. (2008)
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> (<i>Auxenochlorella pyrenoidosa</i>)	Espécie de água doce	100 ug/L EE2	24, 48, 96 e 168 h	Biotransformação/ bioconcentração	EE2 não detectado dentro das células de algas. Biotransformação não induzida.	Della Greca et al. (2008)
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Espécie de água doce / terrestre	100 ug/L EE2	24, 48, 96 e 168 h	Biotransformação/ bioconcentração	EE2 não detectado dentro das células de algas. Biotransformação não induzida.	Della Greca et al. (2008)
			2,5 ug/L EE2	3, 6, 24 e 48 h	Biotransformação/ bioconcentração	Redução não significativa das concentrações.	Lai, Scrimshaw e Lester (2002a).
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Espécie de água doce / terrestre			Biotransformação	EE2 não removido (a espécie removeu apenas o E2 do meio)	Wang et al. (2019)

Classificação (AlgaeBase)	Espécie (sinonímia)	Habitat (AlgaeBase)	Dose	Tempo de exposição	Variável/parâmetro analisada(o)	Efeitos	Referência
	<i>Chlorella</i> sp.	Espécie de água doce ou salobra / terrestre	mg/L EE2 e E2 (1:1)	48h	Inibição do crescimento	EC50 =136,23 mg/L	Wang, Wong & Tam (2012)
			200 ug/L de EE2; e 200 ug/L E2+EE2 (1:1)	7 dias	Atividade da esterase Nível de ROS Fluorescência da clorofila a Complexidade celular Respostas antioxidantes	Aumento contínuo Não significativo Diminuição do tamanho celular e da fluorescência da clorofila nos primeiros 2 dias. Para EE2 tal aumento não foi expressivo. Diminuição da complexidade celular (síntese dos componentes celulares) nos primeiros 2 dias. Aumentos significativos no conteúdo de GSH, mas sem alteração no teor de MDA	Wang, Wong & Tam (2012)
			10 mg/L EE2 e E2 (1:1)	7 dias	Crescimento	Não afetado pela mistura de E2 e EE2 a 10 mg/L	Wang, Wong & Tam (2012)
Phylum Haptophyta Class Coccolithophyceae Order Isochrysidales Family Isochrysidaceae	<i>Isochrysis galbana</i> Parke	Marinha	amostra do elutriado	30 min., 24h, 48h, 72h e 96h	Crescimento	Inibição máxima do crescimento (50 %) para todas as concentrações testadas EE2	Maranho et al. 2015
Phylum Ochrophyta Class Phaeophyceae Order Laminariales Family Laminariaceae	Macroalga <i>Laminaria digitata</i>	Marinha	n.a.	Alga coletada do ambiente	Quantificação do hormônio no tecido algal	EE2 não detectado nas células de algas, tampouco de bivalves e peixes	Álvarez-Muñoz et al 2015
	Macroalga <i>Saccharina latissima</i>	Marinha	n.a.	Alga coletada do ambiente	Quantificação do hormônio no tecido algal	EE2 não detectado nas células de algas, tampouco de bivalves e peixes	Álvarez-Muñoz et al 2015

Classificação (AlgaeBase)	Espécie (sinonímia)	Habitat (AlgaeBase)	Dose	Tempo de exposição	Variável/parâmetro analisada(o)	Efeitos	Referência
Phylum Tracheophyta 1 Class Liliopsida Order Arales Family Lemnaceae	<i>Lemna</i> spp.	"Lentilha de água" (duckweed)	Efluente sintético	6 dias	Testes de remoção (Eficiência sistema de tratamento)	Remoção > 95%	Shi et al. 2010
				0, 2, 5, 20, 60, e 180 min	Testes de sorção (Eficiência do sistema de tratamento)	Remoção de > 80% (rápida adsorção entre 0 e 20 min, seguida por um período de adsorção mais lenta até 60 min)	Shi et al. 2010
	Pool de <i>Anabaena cylindrica</i> , <i>Chlorococcus</i> , <i>Spirulina platensis</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i> , e <i>Anaebena</i> var.	Espécies de água doce e Procarionte marinho oxifototrófico (<i>Chlorococcus</i>)	Efluente sintético	6 dias	Testes de remoção (Eficiência do sistema de tratamento)	Remoção > 50%	Shi et al. 2010
				0, 2, 5, 20, 60, e 180 min	Testes de sorção (Eficiência do sistema de tratamento)	Cerca de 25% do EE2 foi removido (equilíbrio alcançado após 20 min)	Shi et al. 2010

Fonte: dados compilados pela autora a partir das referências listadas na tabela. Informações sobre a classificação taxonômica e habitat natural das algas são provenientes da plataforma AlgaeBase (<https://www.algaebase.org>).

*Bq (becquerel): Unidade de atividade dos radionuclídeos. Descreve taxa de decaimento de uma transição nuclear espontânea por segundo (CARDARELLI, 2003).
EC50 = valores da concentração efetiva de inibição em 50% do crescimento de algas, HC5 = valores da concentração efetiva de inibição do crescimento de algas em 5%, ROS = espécies reativas de oxigênio, SOD = superóxido dismutase, POD = peroxidase, GSH = glutationa redutase, MDA = malondialdeído, SP2 = etinilestradiol glucosídeo, SP3 = 3-β-D-glucopiranosil-2-hidroxi-etinilestradiol, SP4 = 3-β-D-glucopiranosil-6-β-hidroxi-etinil estradiol, SP5 = 17α-etinil-1, 4-estradien-10-ol, 17β-diol-3-ona, SP6 = 6-α-hidroxi-etinilestradiol, SFAs = ácidos graxos saturados, MUFAs = ácidos graxos monoinsaturados e PUFAs = ácidos graxos poli-insaturados.

Em estudo mais recente, Wang e colaboradores (2019) avaliaram a eficiência de mais duas espécies de microalgas (*Haematococcus pluvialis*, *Scenedesmus quadricauda*, além da *S. capricornutum* e da *Chlorella vulgaris*) em biotransformar estrógenos naturais e sintéticos. EE2 mostrou-se persistente no meio e apenas *H. pluvialis* e *S. quadricauda* foram eficientes em remover até 85% ao fim do experimento (40 dias). As duas espécies em questão foram hábeis em remover também E1 e E2, mas com ação limitada sobre o EE2 se comparada aos estrógenos naturais em menor tempo de exposição. Já a microalga *C. vulgaris* só demoveu E2.

A Tabela 4 apresenta uma compilação exaustiva da literatura disponível no Portal Capes e também de artigos publicados em *open-access* que contempla os efeitos do xenobiótico EE2 em algas. Os resultados disponíveis e o recente aumento de estudos neste sentido demonstram que estes organismos não se encontram inertes quando expostos a hormônios típicos de vertebrados. Por sua vez, para macroalgas não foi encontrada nenhuma publicação que aborde quaisquer efeitos resultantes da exposição a estrógenos. A única publicação disponível que contempla macroalgas em ambientes contaminados por EDCs foi realizada como um rastreamento, buscando identificar EDCs e PhACs nos tecidos de organismos de diferentes grupos retirados do ambiente costeiro avaliado (ÁLVAREZ-MUÑOZ et al., 2015). Apesar de detectada a presença de EDCs nos tecidos de bivalves e peixes, nenhum dos compostos avaliados foi identificado nas macroalgas amostradas (Laminariales), e apenas quatro dos 23 fármacos testados foram identificados nos tecidos algais (metroprolol, diazepam, azitromicina e propranolol).

2.3.2 Potencial da macroalga *Ulva* spp. como modelo biomonitor de contaminantes no ambiente aquático

As macroalgas compõem eficientemente a base dos ecossistemas costeiros como parte da produção primária. Chakraborty e colaboradores (2014) avaliaram 12 espécies de algas como bioindicadores de poluição por metais no ambiente marinho e apontaram a alga *Ulva lactuca* como uma das espécies com potencial biomonitor por seus altos índices de bioacumulação para cobre (Cu), ferro (Fe) e zinco (Zn). Outras espécies de *Ulva* também se destacaram pelas concentrações de chumbo (Pb) em seus tecidos. A remoção de metais da fase aquosa utilizando *U. lactuca* também se mostrou eficiente para Pb, cádmio (Cd) e mercúrio (Hg) (HENRIQUES et al., 2017).

Chaudhuri e colaboradores (2007) observaram a remoção de cromo (Cr), manganês (Mn), Pb e cobalto (Co), que apresentaram concentrações mais altas nos tecidos de quase todas as macroalgas testadas em relação ao conteúdo do meio filtrado ou não filtrado. Os autores ainda testaram índices de poluição e de biodisponibilidade dos contaminantes para os organismos costeiros e concluíram que de todas as espécies testadas, *U. lactuca* foi considerada um bom biomonitor principalmente para Cr e arsênio (As), enquanto *U. intestinalis* para Pb e Mn. *Gracilaria tikvahiae* foi apontada como a alga com maior afinidade para Mn. *Fucus vesiculosus*, juntamente com a *U. lactuca*, também acumularam altas concentrações para Cu, Zn, níquel (Ni), e Co.

A germinação de esporos e o crescimento de gametófitos da *Ulva pertusa* foram propostos como variáveis ao monitoramento sensível dos efeitos de metais (Cu, Zn e Cd), formalina e TBTO (óxido de tributilestanho), este último, um composto com reconhecida atividade biocida usado em tintas antiincrustantes, por exemplo (HAN et al., 2008; HAN; CHOI, 2005). O uso de macroalgas para biomonitoramento de contaminantes parece ser melhor para compostos hidrofílicos em relação aos lipofílicos (CHAUDHURI et al., 2007). No entanto, organismos fotossintéticos marinhos têm sido utilizados em estudos de toxicidade e de biotransformação quando da exposição a hidrocarbonetos, compostos EDCs, pesticidas e PhACs com caráter hidrofóbico. Na maioria dos estudos espécies do fitoplâncton têm sido utilizadas, no entanto, mais recentemente espécies de macroalgas foram identificadas também como bons modelos para monitorar esses compostos. Como exemplo, estudos avaliando alterações metabólicas em macroalgas expostas a de hidrocarbonetos, tais como *Hypnea musciformis* exposta a óleo diesel (RAMLOV et al., 2013) e *U. lactuca* à gasolina (PILATTI et al., 2016). Tais estudos resultaram em mudanças significativas nos parâmetros físicos, como a espessura da parede celular e nas assinaturas metabólicas, como os teores de clorofila, por exemplo.

Nestas últimas publicações, os autores apontam a escassez de informações sobre a ação destes compostos mais lipofílicos sobre o metaboloma de macroalgas, deixando claro que mesmo não sendo modelos biológicos de uso frequente, macroalgas também sofrem danos relacionados à exposição a estes contaminantes, sugerindo que as alterações observadas em seus metabolomas possam ser utilizadas como biomarcadores.

O Quadro 1 abaixo destaca características sobre o estrógeno 17 α -etinilestradiol que são importantes ao entendimento da distribuição deste composto no ambiente e comportamento

nos ensaios in vitro que serão discutidos nos capítulos seguintes. Pontua também a realidade da pesquisa sobre EE2 no Brasil e seus efeitos em algas.

Quadro 1: Resumo das características do estrógeno 17 α -etinilestradiol importantes para sua distribuição no ambiente

- **Pouco solúvel em água:** sua solubilidade diminui com o aumento da força iônica, então em águas de maior salinidade as chances de encontrar o hormônio na fase aquosa diminuem;
- **Adsorve-se facilmente a sedimentos finos:** é relatado em concentrações mais altas em sedimentos de ambientes anóxicos;
- Pode ser considerado um composto **persistente**, dependendo das variáveis ambientais, tendo sido relatada meia-vida em ambientes aeróbicos de 15, 17 e 26 dias para efluentes, rios e aquíferos respectivamente. Em ambiente anaeróbicos, tempos de meia-vida superiores a 70 dias foram encontrados para efluentes, sedimentos marinhos e aquíferos;
- Após ingerido, é **parcialmente metabolizado**, sendo excretado em grande parte nas formas conjugadas (glucorínídeo e sulfato), e também na forma livre
 - **Forma conjugada:** inativa biologicamente, solúvel em água. Pode ser hidrolisada gerando a forma livre por ação de sistemas enzimáticos de micro-organismos em ETEs, ou no ambiente natural
 - **Forma livre:** ativa biologicamente e pouco solúvel
- Ainda poucos estudos no Brasil;
- Possui alto potencial estrogênico, mesmo em concentrações muito baixas (<1 ng/L) na fauna aquática;
- Em algas, a exposição aos estrógenos pode **alterar as taxas de crescimento e amenizar danos induzidos por ROS**, decorrentes de outros estresses como exposição a metais pesados.

Fonte: Informação resumida a partir do texto da revisão bibliográfica onde constam as respectivas referências bibliográficas.

3 METODOLOGIA GERAL

A metodologia geral refere-se à implantação e manutenção dos cultivos para obtenção da biomassa algal utilizada nos experimentos. Detalhes sobre o desenho experimental, amostragens e análises serão apresentados em cada capítulo, devido a suas especificidades.

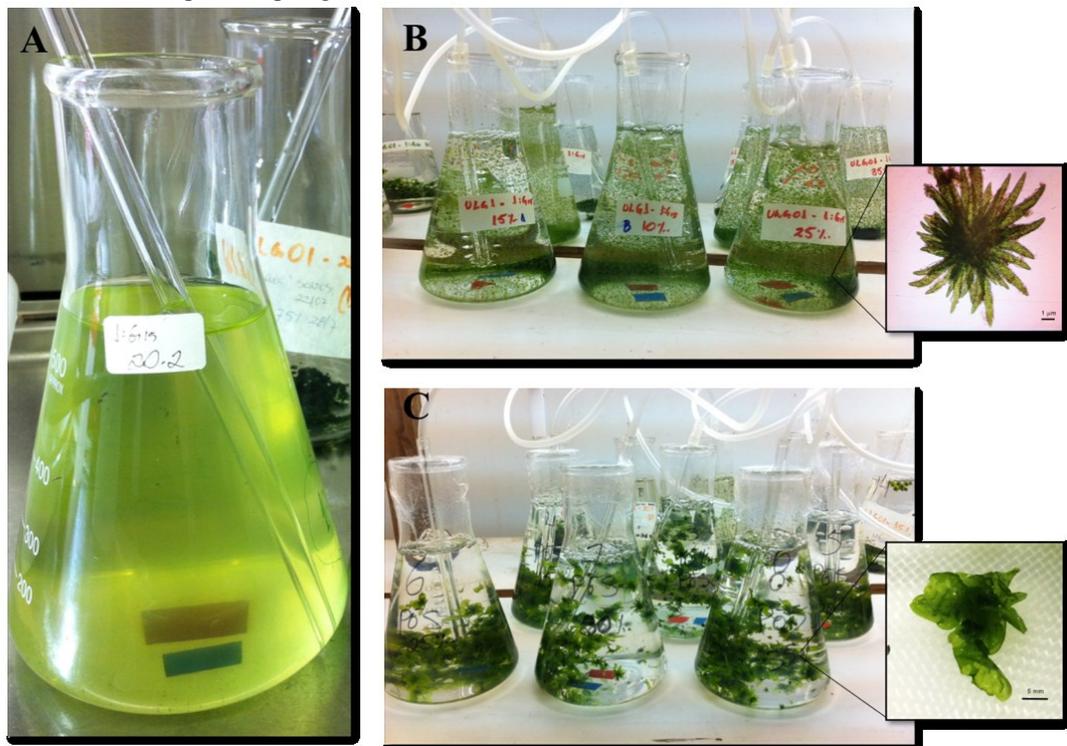
3.1 IMPLANTAÇÃO DOS CULTIVOS

A espécie utilizada nos ensaios foi a macroalga *Ulva lactuca*, proveniente da Lagoa da Conceição (Florianópolis, Santa Catarina), coletada em abril de 2016. As amostras foram cultivadas no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV-CCA/UFSC) em meio de cultura com salinidade igual a 10, valor semelhante àquele da água do local de coleta. Um único indivíduo foi separado, limpo e mantido em laboratório, sob condições de fotoperíodo de 12h: 12h ($284,2 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ por microamp), aeração ininterrupta (compressor odontológico isento de óleo, Schuster S45) e temperatura constante ($23 \pm 3^\circ\text{C}$). Semanalmente, o talo foi repicado mantendo fragmentos de talo de aproximadamente 1,5 cm. O processo de repicagem era realizado no momento da renovação do meio de cultura Provasoli (COELHO et al., 2012) a uma concentração de 25% (v/v). A metodologia foi definida baseada em observação pessoal na manutenção de cultivos anteriores para a mesma espécie e em estudos que relacionaram o estresse osmótico da variação da salinidade, a fragmentação, variação da temperatura e disponibilidade de nitrogênio como inibidores ou estimuladores da reprodução em diferentes espécies de *Ulva*. (CHÁVEZ-SÁNCHEZ et al., 2018; FONG et al., 1996; GAO et al., 2017). Assim, a cultura foi mantida em erlenmeyers de 1 ou 2 L, mantendo-se uma proporção aproximada de 1,5 g massa úmida/ 0,9 L de meio a cada troca de meio de cultivo com concentração reduzida de nitrogênio (Provasoli 25%).

Após três semanas em laboratório, alíquotas de aproximadamente 3g de biomassa algal foram coletadas e transferidas a meio de cultura (1,8 L) com salinidade aumentada para 15. Uma semana após, a presença de células reprodutivas em suspensão era visualmente perceptível, i.e. meio de cultura com aparência de névoa esverdeada, ainda clara. Quando a coloração esverdeada do meio se tornou mais forte e homogênea, o material foi filtrado em peneiras de malha de aproximadamente 1 mm e o material particulado descartado. Do material em suspensão, foram coletadas alíquotas do inóculo e estas transferidas a meio de cultura com salinidades variando de 10 a 35 %. Após algumas semanas, detectou-se a formação de

aglomerados celulares em suspensão (Figura 1-B), os quais foram novamente subcultivados dentro das respectivas salinidades para aumento de biomassa, até que as frondes estivessem visivelmente desenvolvidas (Figura 3-C). Neste estágio, amostras foram coletadas e fragmentadas com auxílio de um mixer para separação das frondes dos aglomerados, permitindo o crescimento destas de forma livre. Para incremento da biomassa algal, a repicagem das culturas ocorreu a cada 2-3 dias, ao invés de 1 semana como anteriormente realizado. Os ensaios foram conduzidos com indivíduos adultos, originados de um espécime somente (geração F1).

Figura 3: Fases do cultivo de *Ulva lactuca*. (A) células reprodutivas em suspensão; (B) observação de aglomerados de células reprodutivas, escala do detalhe = 1 μ m; e (C) conglomerados com frondes desenvolvidas e aptas à repicagem, escala do detalhe = 5 mm.



Fonte: Autor.

No caso de contaminações, as algas cultivadas foram lavadas com Triton X-100 (0,1%, v/v) por 15-20 segundos, rinsadas com água destilada (10 s) e repetidas vezes com água do mar. A lavagem foi realizada tantas vezes quanto necessário, evitando-se o uso frequente de Triton. Em função da associação bacteriana que produz compostos morfogenéticos (p.ex. talusina) necessários à formação das frondes no gênero *Ulva* (MATSUO et al. 2005 apud WICHARD et al., 2015), evitou-se o uso de penicilina ou outros antibióticos à manutenção de uma cultura axênica, optando-se pelo cultivo unialgal não axênico.

A água do mar utilizada na manutenção dos cultivos e nos experimentos foi coletada na praia da Barra da Lagoa (Florianópolis, Santa Catarina), por meio de sistema de bombeamento do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM). O transporte da água foi feito por caminhão pipa até o Laboratório de Ficologia (LAFIC), onde a água foi previamente decantada, seguido de coleta em recipientes de 20L e envio ao LMBV, onde fora armazenada em caixa d'água de 250 litros. Antes do uso, a água foi esterilizada por meio de sistema de filtração ($\emptyset = 25, 5$ e $1 \mu\text{m}$) acoplado à lâmpada ultravioleta (Hopar Ultra Violeta UV-611, 9w) e armazenada para uso. A esterilização da água ocorreu em momentos que antecederam o manejo dos cultivos e os experimentos.

3.2 ACLIMATAÇÃO DAS ALGAS PRÉ-EXPERIMENTO E ESTIMATIVA DE PESO SECO

Previamente aos experimentos, a biomassa algal foi cortada com puncher (n. 8) em discos de 8 mm, os quais foram mantidos por 24h ou 48h nas mesmas condições de cultivo em que o experimento seria levado a curso. Para o cálculo da biomassa inicial do experimento, a média do peso seco de um conjunto de discos com o mesmo número de amostras (n) designado para cada réplica do experimento foi calculada, sendo este valor atribuído ao peso inicial para todos os tratamentos.

4 CAPÍTULO I – IDENTIFICAÇÃO DO ESTRÓGENO 17 α -ETINILESTRADIOL EM AMBIENTES COSTEIROS

Este primeiro capítulo apresenta um estudo de caso sobre a presença do 17 α -etinilestradiol em ambientes naturais costeiros de Florianópolis e o atual estado do conhecimento deste estrógeno em águas brasileiras.

4.1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional e o desenvolvimento industrial em zonas costeiras promove o aumento de tensões ambientais nestas regiões. Como resultado, ambientes aquáticos são submetidos a pressões oriundas de diversas fontes, tais como as descargas de resíduos municipais e industriais, o escoamento agrícola, o transbordamento de esgotos combinados e os derramamentos de resíduos de substâncias potencialmente tóxicas (ALAN F. BLUMBERG; RICHARD P. SIGNELL; HARRY L. JENTER, 1994). Antagonicamente, o uso difundido de contraceptivos orais que aparece como um importante recurso utilizado para conter esse crescimento populacional, também pode contribuir para aumentar as pressões já infringidas ao ambiente e contribuem para uma série de problemas na qualidade da água em balneários urbanos e em reservatórios destinados ao consumo de água potável.

O estrógeno artificial 17 α -etinilestradiol (EE2) é liberado diariamente por mulheres que fazem uso de contraceptivos orais que, junto a outros hormônios naturais e substâncias exógenas de uso rotineiro, faz parte de um grupo ambientalmente importante de compostos conhecidos como disruptores endócrinos (EDCs - *Endocrine disruptor compounds*) (ADEEL et al., 2017). O EE2 é parcialmente metabolizado e pode ser excretado na sua forma livre biologicamente ativa, ou como conjugados de sulfato ou glucuronídeo de EE2, solúveis em água e biologicamente inativos (ARIS; SHAMSUDDIN; PRAVEENA, 2014). Nas últimas décadas, diversas revisões e estudos foram publicados sobre a presença destes compostos em ambientes aquáticos, os quais destacam que mesmo em concentrações traço, tais compostos provocam efeitos adversos em animais e à saúde humana (JOBBLING; OWEN, 2013; PAL et al., 2010). O crescente número de publicações sobre o tema chama a atenção para o fato de que este é considerado um problema de contaminação em escala global (ADEEL et al., 2017; ARIS; SHAMSUDDIN; PRAVEENA, 2014; BARREIROS et al., 2016; BERTIN; INOSTROZA; QUIÑONES, 2009; FAUZAN et al., 2016; HAMID; ESKICIOGLU, 2012; JOBBLING; OWEN, 2013; LAI; SCRIMSHAW; LESTER, 2002a; SILVA; OTERO; ESTEVES, 2012) ainda que

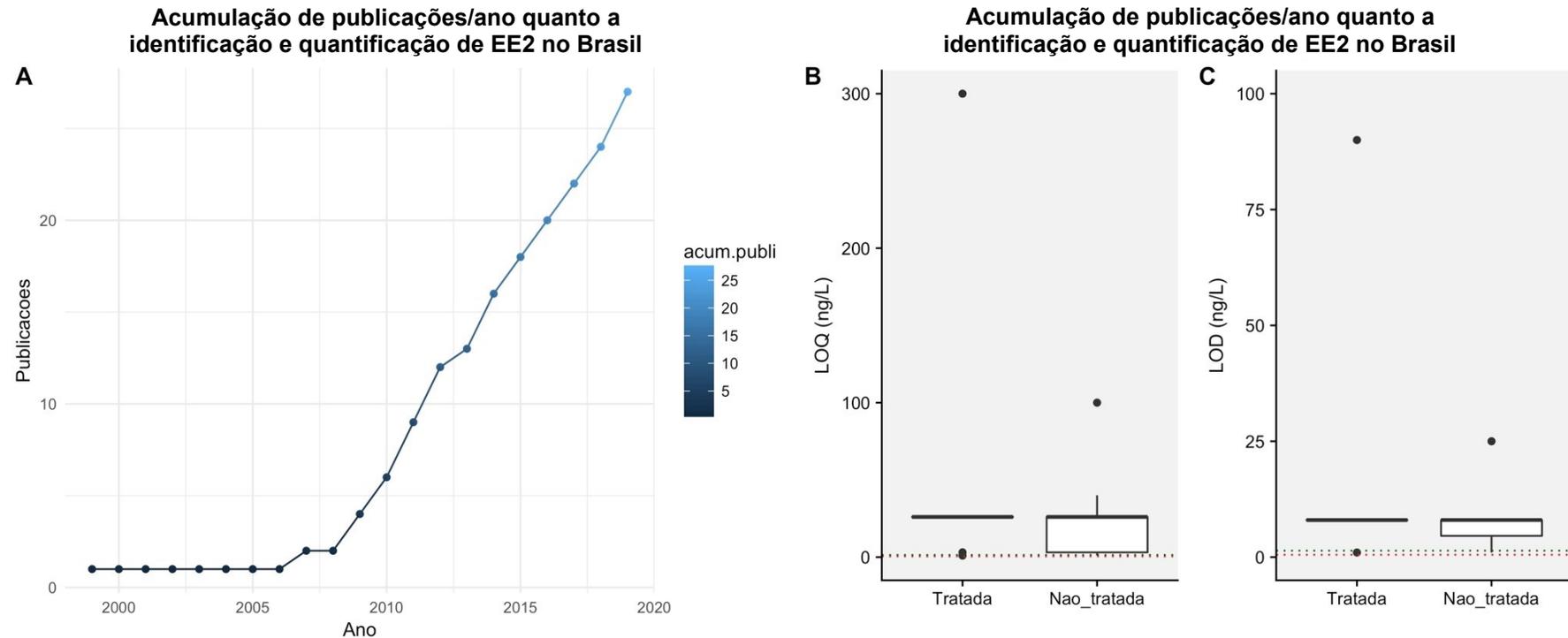
distribuído de forma assimétrica (ADEEL et al., 2017). A ocorrência de estrógenos em rios e águas superficiais, por exemplo, é identificada de forma concentrada ao meio-oeste americano, à costa leste da América do Norte, ao México, Equador, Brasil e Chile e a países vizinhos ou próximos à bacia mediterrânea da Europa, à Ásia e ao sul da Austrália (ADEEL et al., 2017). Quanto à contaminação específica pelo hormônio artificial EE2, Adeel e colaboradores (2017) em ampla revisão sobre o assunto, destacam o Brasil e diversos locais no Extremo Oriente como áreas preocupantes, onde altos níveis de EE2 foram registrados em ambientes fluviais. Outro ponto que pode ser observado a partir de revisões realizadas nas últimas décadas é a falta de informação sobre o real alcance dos efeitos desses poluentes nos diversos componentes da biota exposta a esses xenobióticos (JOBILING; OWEN, 2013), principalmente em ambientes costeiros (BARREIROS et al., 2016; LAI; SCRIMSHAW; LESTER, 2002a).

Dentre os compostos deste grupo, os hormônios sexuais femininos estrona (E1), estradiol (E2) e estriol (E3), que ocorrem naturalmente em mamíferos, e em especial o hormônio artificial EE2, se destacam por seu já comprovado potencial disruptor à fauna aquática (JOBILING; OWEN, 2013; SANDERSON et al., 2004). Destes, o etinilestradiol é considerado o mais potente como disruptor endócrino (Tabela 1), além de ser também o mais persistente em ambientes naturais (Tabela 2, ADEEL et al., 2017; YING; KOOKANA, 2003).

Apesar da ocorrência de estrógenos em sistemas aquáticos ser um problema mundialmente reconhecido, frequentemente estudos de identificação e quantificação de estrógenos em ambientes naturais falham na análise específica do EE2, devido aos altos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) dos métodos adotados. No Brasil, esta realidade torna-se preocupante quando percebe-se o baixo número de publicações de análises de estrógenos em sistemas aquáticos naturais, mesmo apresentando amplo território e grande riqueza em recursos hídricos.

O primeiro registro sobre a presença do contaminante no país deu-se em 1999, com a estimativa da eficiência de uma estação de tratamento de efluentes na Penha, Rio de Janeiro (TERNES et al., 1999). Todavia, o interesse pelo assunto, especialmente pelo estrógeno artificial EE2, pode ser notado somente na última década (Figura 4). Mesmo em ritmo crescente, as publicações apresentam características bem distintas quanto aos métodos analíticos, e em alguns casos, apresentam altos limites de detecção e quantificação para o tipo de ambiente amostrado (e.g., LOD = 25 – 650 ng/L; LOQ = 100 – 2.170 ng/L; CORDEIRO et al., 2012; MELO; BRITO, 2014; SODRÉ; LOCATELLI; JARDIM, 2010).

Figura 4: Representação gráfica sobre dados de identificação e quantificação do EE2 no Brasil.



Fonte: Autor.

(A) Curva de acumulação do número de publicações referentes a dados de identificação e quantificação do estrógeno EE2 em ambientes naturais, ou estações de tratamento de efluentes em território brasileiro. Não constam aqui revisões que abordaram o tema sem terem realizado a identificação do EE2 realizada pelos próprios autores, nem trabalhos protocolares ou de modelagem que utilizaram dados provenientes de outras publicações. (B) e (C) Limites de quantificação e de detecção para águas tratadas (Tratada = “drinking water”, “tap water”, “treated water”) e águas não tratadas (Nao_tratada = “reservoir”, “underground water”, “water source” ou “water intake”) em pontos de captação referenciados para o Brasil. Linhas de referência verde e vermelha apontam valores máximos respectivamente encontrados por Benotti e colaboradores (2009), em fontes de captação de água nos Estados Unidos (1,4 ng/L) e por Kuch; Ballshmiter (2001) em amostras de água potável na Alemanha (0,5 ng/L). Pra evitar grandes distorções no gráfico, dados referentes à publicação de Melo e Brito (2014) foram omitidos por apresentarem valores muito acima das demais referências, i.e., LOD = 650 ng/L e LOQ = 2.170 ng/L

Até o momento, 27 artigos com resultados de ensaios para a quantificação/identificação do EE2 em território brasileiro foram publicados e estão disponíveis em revistas *open-source* ou na Plataforma de periódicos da CAPES. O número de publicações aumenta se considerarmos outras abordagens sobre o tema, tais como revisões sobre a presença e normativas quanto ao EE2 em águas brasileiras (CUNHA et al., 2016), a detecção de outros fármacos e compostos estrógenos naturais na região costeira (DO NASCIMENTO et al., 2018; PEREIRA et al., 2016), a análise da atividade estrogênica em águas naturais (DIAS et al., 2015), a modelagem de distribuição de EDCs em estuários (GIMILIANI; FONTES; ABESSA, 2016) e ensaios de toxicidade *in vitro*, ou desenvolvimento de novos protocolos para quantificação do hormônio (PEREZ; SIMÕES; CODOGNOTO, 2016), porém, não apresentando novos dados de referência à possível presença do hormônio em águas brasileiras. Dentre os trabalhos específicos à quantificação de etinilestradiol, destaca-se o de Kuster e colaboradores (2009), pelo detalhamento dado a análise e distribuição deste composto, nem sempre observado de forma clara em outras publicações. De forma similar, o estudo de Barreiros e colaboradores (2016) merece destaque pela abordagem e detalhamento dados às técnicas analíticas aplicadas à ampla gama de matrizes ambientais investigadas quanto ao analito em tela.

Considerando que este é um micropoluinte que apresenta comprovados efeitos à fauna aquática, mesmo em concentrações inferiores a 1 ng/L (CALDWELL et al., 2008), dados resultantes de técnicas com baixa sensibilidade analítica podem fornecer a falsa impressão de que os recursos naturais brasileiros estariam livres do impacto daquele xenobiótico. O estrógeno EE2 ainda não foi detectado em águas potáveis, reservatórios, ou águas subterrâneas brasileiras, por exemplo. Isso, no entanto, não significa a sua ausência nestes ambientes de fato, uma vez que os limites de detecção e quantificação considerados estavam, em sua maioria, acima dos valores máximos relatados para esses ambientes em outros países (Figura 4, B e C; vide Anexo C). O levantamento sobre o atual estado de conhecimento e distribuição de estrógenos no Brasil evidencia a importância da realização de ensaios que contemplem de fato em sua metodologia intervalos de concentração de compostos que possivelmente estariam em cada ambiente amostrado.

Na literatura consultada para o EE2 em águas brasileiras, não foi constatado de forma clara se os valores de detecção e quantificação são específicos unicamente à etapa analítica, ou se consideram também o fator de concentração do analito decorrente de etapas prévias à análise, como

por exemplo, técnicas de extração em fase sólida (SPE, *solid phase extraction*). Os gráficos B e C da Figura 4 evidenciam os limites de quantificação e detecção para águas tratadas (i.e., água de torneira) e águas não tratadas em pontos de captação (i.e. reservatórios, águas subterrâneas e nascentes) conforme dados referenciados para o Brasil.

Os resultados até então disponíveis, tanto para reservatórios, como para estações de tratamento de água e amostras de água potável no país, são negativos ou inconclusivos (BERGAMASCO et al., 2011; CORDEIRO et al., 2012; JARDIM et al., 2012; LÓPEZ-DOVAL et al., 2017; MACHADO et al., 2016; MAYNARD et al., 2019; MELO; BRITO, 2014; SODRÉ et al., 2007; SODRÉ; LOCATELLI; JARDIM, 2010). No entanto, as concentrações registradas em águas superficiais no Paraná e em São Paulo apresentam valores muito acima do encontrado como referência máxima em outros países (Figura 4, B e C) Em trabalho de revisão, Aris e colaboradores (2014) apresentam valores máximos de EE2 de 0,40 ng/L para amostras em rios e águas superficiais nos Países Baixos, 0,70 ng/L na Alemanha, 2 ng/L no Irã e 27,4 ng/L em Taiwan. Kush e Ballschmiter (2001) também relatam valor de 5,1 ng/L em ponto à jusante do descarte de efluentes na Alemanha, sendo que no Brasil, os valores máximos nesses ambientes alcançaram 4390 ng/L em regiões mais impactadas do Rio Atibaia, responsável pelo abastecimento da região metropolitana de Campinas (MONTAGNER; JARDIM, 2011). Valores bastante elevados, i.e., 148000 ng/L, também foram detectados no Rio Iguaçu, sugerindo a possibilidade de efeitos importantes sobre a saúde da população da região metropolitana de Curitiba (IDE et al., 2017). Estudos de dosagem do EE2 em concentrações menores àquelas supracitadas, mas ainda acima da média internacional revelaram valores de 25,0 a 310,0 ng/L , 45,0 a 63,0 ng/L e 5,9 ng/L, respectivamente em amostras de águas de rios dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná (MACHADO et al., 2014; MOREIRA et al., 2009, 2011; SODRÉ et al., 2007, 2010).

Apesar dos valores impactantes, a pouca informação sobre a presença e ação de hormônios sexuais femininos e equivalentes em recursos hídricos brasileiros é refletida na ausência de dispositivos legais ou normativos que abordem esses poluentes emergentes. Nem as resoluções do CONAMA vigentes para poluentes orgânicos em corpos d'água, nem as portarias do Ministério da Saúde que definem a qualidade da água própria para o consumo humano, apresentam quaisquer limites para o estrogênio 17 α -etinilestradiol. A postura normativa brasileira neste aspecto difere da iniciativa já vigente em outros países, como nos Estados Unidos que faz o monitoramento de poluentes suspeitos, entre eles o EE2, e em alguns países europeus onde foi regulamentada a

concentração de 0,035 ng/L como limite do EE2 em corpos hídricos (CUNHA et al., 2016; USEPA, 2016).

Neste contexto, este capítulo descreve o estudo da análise de ocorrência do estrógeno 17 α -etinilestradiol em amostras de águas e biomassa algal coletadas na ilha de Florianópolis (Santa Catarina), uma região costeira com alto fluxo de visitantes durante a temporada de verão. Para tal, utilizou-se uma técnica baseada no reconhecimento do analito por anticorpo monoclonal específico, i.e., ensaio imuno-enzimático (ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), a partir de kit analítico disponível comercialmente (*Cloud-Clone Corp – CCC, USA*).

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

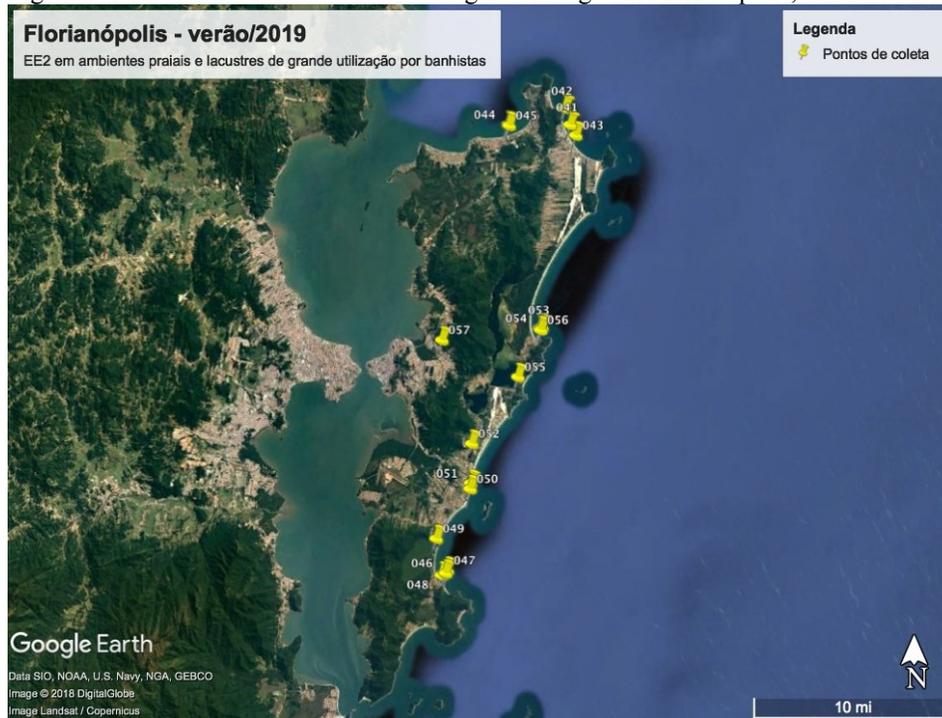
Foram realizadas duas amostragens para a quantificação de etinilestradiol (EE2) na ilha de Santa Catarina. Amostras de verão foram coletadas nos dias 2 e 3 de janeiro de 2019 (pós-réveillon), período crítico dado ao grande número de turistas, e no outono (31/março/2019).

As coletas foram realizadas no período da tarde em pontos amostrais na Ilha de Santa Catarina, apontados na Figura 5. Quatro pontos na região norte da ilha (Costão esquerdo da praia dos Ingleses, foz do Rio Capivari na praia dos Ingleses, Trapiche da praia de Canasvieiras e foz do Rio do Brás na praia de Canasvieiras), um ao leste da ilha (Lagoa da Conceição, próximo ao trapiche do Bar do Boni – final da avenida das Rendeiras) e três ao sul da ilha (foz do Rio Sangradouro na praia do Matadeiro, Foz do Riozinho do Campeche e arco praial direito da Lagoa do Peri) foram amostrados.

4.2.1 Amostras de água

As amostras de verão foram coletadas em garrafas de borossilicato (500 ml), transportadas ao LMBV em banho de gelo, aliquotadas (5 alíquotas, 100 ml cada), liofilizadas (3 alíquotas) e conservadas em freezer, a -20°C. As alíquotas remanescentes (2 alíquotas) foram armazenadas a -80°C durante aproximadamente 4 meses. Para as amostras de outono, 1500 ml de água foram coletados e armazenados em refrigerador (2-4°C) por no máximo 72h até o momento de análise.

Figura 5: Pontos amostrais das coletas de água e de alga em Florianópolis, SC.



Fonte: Autor (construído por meio da plataforma do Google Earth, disponível em <https://www.google.com.br/intl/pt-BR/earth/>)

4.2.2 Amostras algais

Espécimes de *Ulva* spp. foram coletadas em três dos pontos amostrais de água somente no verão. As amostras foram mantidas resfriadas até que fossem devidamente selecionadas e limpas. Previamente ao congelamento, as amostras foram lavadas rapidamente em água destilada e centrifugadas para eliminação do excesso de água. A biomassa algal foi liofilizada e conservada em freezer (-80°C) até o momento da extração.

4.2.3 Parâmetros ambientais

Foram utilizados dados de balneabilidade e contagem de coliformes fecais disponibilizados pelo Instituto do Meio Ambiente de Santa Catarina – IMA (IMA, 2019). As coletas realizadas pelo IMA, usualmente no período da manhã, coincidem com as datas amostrais (mesmo dia \pm 1 dia) deste estudo. No entanto, optou-se por coletar as amostras de alga e água ao fim da tarde, aumentando as chances de encontrar o hormônio em decorrência da presença dos

banhistas ao longo do dia. Foram coletados dados de marés disponibilizados pela Marinha do Brasil (MARINHA DO BRASIL, 2019), enquanto que a salinidade das amostras de água foi medida em laboratório por meio de refratômetro portátil (Tabela 5).

Tabela 5: Localização geográfica dos pontos amostrais e informações da maré no momento amostral, disponibilizados pelo Centro de Hidrografia da Marinha do Brasil, Florianópolis, 2019. Códigos das amostras: sum = verão, aut – outono.

Amostras	Local	Latitude	Longitude	Localização	Maré
Ing_sum	Ingleses	27°24'51.15"S	48°24'13.18"O	Norte	Enchente
Cap_sum	Rio Capivari	27°25'33.73"S	48°23'58.40"O	Norte	Enchente
Cap_aut	Rio Capivari	27°25'33.73"S	48°23'58.40"O	Norte	Enchente
Can_sum	Trapiche de Canasvieiras	27°25'33.65"S	48°27'0.34"O	Norte	Enchente
Bras_sum	Rio do Brás	27°25'35.64"S	48°26'57.53"O	Norte	Enchente
Bras_aut	Rio do Brás	27°25'35.64"S	48°26'57.53"O	Norte	Enchente
LCon_sum	Lagoa da Conceição	27°36'31.76"S	48°26'31.66"O	Leste	Enchente
LCon_aut	Lagoa da Conceição	27°36'31.76"S	48°26'31.66"O	Leste	Enchente
Sang_sum	Foz do Rio Sangradouro	27°45'4.15"S	48°30'4.69"O	Sul	Vazante
Sang_aut	Foz do Rio Sangradouro	27°45'4.15"S	48°30'4.69"O	Sul	Enchente
Rioz_sum	Riozinho do Campeche	27°41'9.50"S	48°28'50.97"O	Sul	Vazante
Rioz_aut	Riozinho do Campeche	27°41'9.50"S	48°28'50.97"O	Sul	Enchente
Peri_sum	Lagoa do Peri	27°43'33.78"S	48°30'32.17"O	Sul	Vazante*
Peri_aut	Lagoa do Peri	27°43'33.78"S	48°30'32.17"O	Sul	Enchente*

Fonte: Autor.

* A lagoa do Peri encontra-se 3 m acima do nível do mar e não sofre a influência de maré enchente.

4.2.4 Concentração do analito em amostras de água

Para as amostras de verão, as alíquotas de água liofilizadas foram reconstituídas em 1,5 ml de etanol p.a. (0,5 ml em cada alíquota), seguido da adição de 200 ml da mesma amostra congelada, considerando-se assim um total de 500 ml de amostra pré-concentrada em volume de 200 ml, previamente à filtração e concentração do analito via extração de fase sólida (SPE). Para amostras de outono, foram considerados 1500 ml de amostra fresca.

Todas as amostras de água foram filtradas sob vácuo (membranas GF1, 0,7 µm) para a remoção de material particulado. O procedimento de extração em fase sólida foi realizado utilizando colunas (3) contendo 500 mg (3ml) de octadecil (C18) como adsorvente (Bakerbond SPE, the Netherlands) por amostra. As colunas foram pré-condicionadas com 5 ml metanol, 5 ml de solução metanol:água (v/v) e 5 ml de água (adaptado Allinson e colaboradores, 2010). Durante as extrações, utilizou-se um sistema a vácuo (Supelco Visiprep. USA - fluxo 2,5-3 ml/min, -50 bar, ~ 3h/amostra) para otimizar a concentração dos analitos. Após a adsorção dos analitos, o sistema de SPE foi eluído com 7 ml de água destilada para eliminação do sal retido no adsorvente, seguido da recuperação dos compostos via eluição com metanol p.a. (7 ml, 20 min/amostra). Os eluatos (3) foram combinados, perfazendo um volume total de 21 ml por amostra e concentrados sob pressão reduzida (rotaevaporador, 35-40°C, 80-100 rpm). Os extratos foram armazenados a -80°C até o momento do ensaio enzimático (*enzyme-linked immunosorbent assays*). Durante todo o processamento pós-coleta das amostras estas foram mantidas protegidas da luz.

4.2.5 Identificação do analito na biomassa algal (separação em duas fases)

A extração do analito em algas foi realizada a partir de 2g de biomassa seca, macerada sob nitrogênio líquido. Àquela biomassa foram adicionados 80 ml de metanol (1: 40, v/m), seguido de agitação e resfriamento (4°C), sob o abrigo de luz, por 1h. O extrato organosolvente foi filtrado, transferido para um funil de separação (500 ml) e adicionado de água e acetato de etila (metanol: água: acetato de etila, 4: 12 :3, v/v/v). À essa mistura, foram adicionados 2g de NaCl para forçar a separação de fases entre os solventes e a eventual concentração do hormônio na fase apolar. Após 30 min de incubação, a separação de fases mostrou-se estável, recuperando-se a fase inferior (metanol: água), a qual 60 ml de acetato de etila foram adicionados. Esta solução foi vigorosamente agitada, mantida em repouso por 30 min, seguindo-se a recuperação da fase apolar, a qual foi combinada com aquela oriunda da primeira extração líquido-líquido. A fase residual, i.e., metanol: água retornou ao funil de separação, sendo adicionada de 30 ml de hexano, com posterior agitação e incubação por 30 min. Após esse período, a fase aquosa foi descartada e as fases apolares recuperadas foram combinadas e transferidas a funil de separação (30 min) para remoção de eventual fase aquosa residual. A fração apolar foi coletada e concentrada em rotaevaporador (35-

40°C, 80-100 rpm), seguido de armazenamento em balões a - 80°C até o momento do ensaio imunoenzimático à detecção do xenobiótico de interesse.

A utilização do sistema de solventes (3) acima descrito objetivou reduzir a concentração de outros analitos derivados do metabolismo algal que pudessem dificultar a recuperação do EE2, eventualmente interferindo na reação competitiva do EE2 com os anticorpos monoclonais utilizados no ensaio de ELISA durante a etapa analítica.

4.2.6 Fator de concentração

Imediatamente antes da análise das amostras, o eluato/extrato de cada amostra foi reconstituído em 50µL de etanol p.a. e gradualmente adicionado de pequenos volumes de PBS (100-500 µL) até o volume final de 2,5 ml (etanol 2%, v/v), sob agitação magnética. Em seguida foram realizados os procedimentos ao teste de ELISA acima descritos às amostras de água e de biomassa algal. Considerando os volumes utilizados de amostras de água no verão (500 ml) e no outono (1500 ml), os fatores de concentração estimados foram de 200x e 600x, respectivamente. Para amostras algais, o fator de concentração foi de 0.8 para a massa seca (~ 20 a 25% do peso fresco da alga), gerando um fator de concentração de 3,2 a 4 vezes, se referenciado ao peso úmido.

4.2.7 Quantificação de etinilestradiol por ensaio imuno-enzimático (ELISA)

Para a quantificação do EE2 utilizou-se um kit comercial de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Cloud-Clone Corp – CCC, USA*), com anticorpo monoclonal para EE2. A reação de inibição é competitiva entre o etinilestradiol marcado com biotina e aquele não marcado (amostras ou padrões) e o anticorpo pré-revestido à microplaca. Após incubação de 1h, a 37°C, o conjugado não ligado foi removido do meio de reação utilizando-se a solução de lavagem do próprio kit. Em seguida, a solução de detecção de avidina conjugada à HRP (*Horseradish Peroxidase*) foi adicionada a cada poço da microplaca, incubando-se o material por 30 min, a 37°C. A quantidade do conjugado HRP ligado em cada poço é inversamente proporcional à concentração de EE2 na amostra. Após subsequente lavagem, o substrato TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) foi adicionado ao meio de reação, seguido de incubação por 10-20 min, a 37°C. Após a adição do

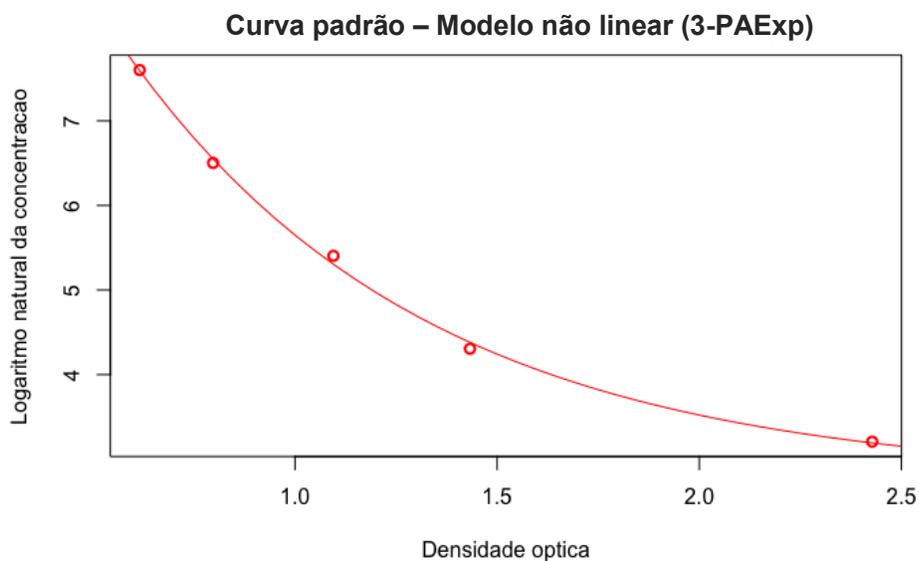
substrato, o meio de reação adquiriu coloração azul, cuja intensidade é inversamente proporcional à concentração do analito em estudo. A solução de interrupção da reação enzimática foi adicionada e, nesta etapa, a coloração do meio tornou-se amarela, sendo a absorbância registrada a 450 nm.

4.2.7.1 Curva padrão para quantificação de EE2 nas amostras

Para a estimativa das concentrações de EE2 nas amostras, uma curva de calibração foi construída, seguindo as orientações do fabricante do kit ELISA, em gráfico semi-log e intervalo de concentrações de 24,69 a 2000,00 pg/ml.

Solução tampão fosfato (*Phosphate-Buffered Saline*, PBS) foi utilizado em substituição do padrão analítico como meio de reação negativa à detecção do analito (i.e., branco). Os limites de quantificação (LOQ) e detecção (LOD) foram estimados a partir dos coeficientes resultantes da curva (Figura 6), sendo que o LOD foi definido como a menor concentração de proteína que poderia ser diferenciada de zero. Conforme instruções do fabricante, aquela variável foi determinada subtraindo-se dois desvios padrão do valor médio da densidade ótica de 5 réplicas do padrão zero (i.e., branco) e calculando-se a concentração correspondente.

Figura 6: Curva padrão de EE2 utilizada ao ajuste do modelo de regressão não-linear (*3-parameter asymptotic exponential*) para estimar as concentrações daquele analito em amostras de água.



Fonte: Autor.

A correlação entre a concentração de etinilestradiol na amostra e a intensidade do sinal do ensaio é negativa, pois a técnica de imunoensaio enzimático baseia-se na inibição competitiva entre substratos. Para obter-se o melhor ajuste à curva padrão, diversos modelos de regressão foram testados, estando os detalhes disponíveis no apêndice 2. O melhor modelo matemático ao ajuste da curva padrão foi o não-linear, usando a função com 3 parâmetros assintótica e exponencial (3-PAExp). O ajuste foi realizado utilizando *scripts* em sistema de computação científica R (<http://www.r-project.org>), tendo o RStudio como interface. Para o modelo escolhido foi utilizada a função “nls” (*non-linear least squares*) e o pacote *ggplot2*. A função *predict* foi usada para a análise de correlação entre os valores de concentração estimados a partir dos coeficientes resultantes da regressão não-linear e os valores originais de concentração. A equação 1 abaixo foi utilizada para o ajuste da curva padrão. A escolha dos parâmetros iniciais ($a= 2,20$, $b= 6,0$ e $c= 0,71$) ao cálculo considerou as sugestões de Crawley (2013), observando-se a curva semi-log gerada com os dados resultantes para os pontos da curva (Figura 6). Os valores iniciais de $x= 0,75$ e $y= 6,2$ coincidem com o ponto onde a curva decresceu de maneira mais intensa. Os critérios à estimativa desses parâmetros iniciais também encontram-se descritos no apêndice 2.

$$y = a - be^{-cx} \quad (1)$$

4.3 RESULTADOS

O modelo matemático utilizado apresentou forte correlação ($r = 0,999$) entre os valores de concentrações conhecidos e aqueles estimados via curva padrão. Observando os resultados resumidos no Quadro 2 abaixo, os parâmetros diferiram significativamente ($p < 0,01$), evidenciando que um modelo de 3 parâmetros se adequa razoavelmente à predição de valores de concentração do analito em estudo nas amostras de água. Assim, a equação da curva padrão foi utilizada para a estimativa das concentrações de EE2 nas amostras, adotando a partir de então os parâmetros a , b e c resultantes do modelo para a estimativa das concentrações encontradas nas amostras.

Os limites de quantificação e detecção foram diferenciados entre as estações do ano em função dos fatores de concentração distintos, de forma que LOQ e LOD foram estimados

respectivamente como 0,12 e 0,09 ng/L (amostras de verão) e 0,04 e 0,03 ng/L (amostras de outono). Em função dessa diferença na metodologia adotada entre as duas estações de coleta e, conseqüentemente, entre LOD e LOQ resultantes, comparações de detecção entre as estações devem ser feitas com cautela, uma vez que a não detecção no verão em certos pontos poderia ter resultado positivo, caso o volume de água considerado na etapa de concentração do analito fosse equiparado à de outono

Quadro 2: Resumo dos resultados conforme obtidos pela função *coef()* utilizada em linguagem R, que resume os coeficientes *a*, *b* e *c* (*Parameters*) obtidos na regressão e que serão usados para o cálculo das concentrações das amostras (*ln_conc* = logaritmo natural das concentrações da curva; *kit_abs* = absorvâncias a 450 nm dos pontos da curva; *a*, *b* e *c* (*Formula*) = parâmetros iniciais estimados pela autora para ajuste do modelo aos dados da curva (Crawley, 2013).

```
## Formula: ln_conc ~ a - b * exp(-c * kit_abs)
##
## Parameters:
## Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## a 2.7666 0.1790 15.45 0.00416 **
## b -11.0181 0.6286 -17.53 0.00324 **
## c 1.3407 0.1199 11.18 0.00791 **
## ---
## Significance codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
## ## Residual standard error: 0.09468 on 2 degrees of freedom
##
## Number of iterations to convergence: 5
## Achieved convergence tolerance: 4.351e-06
```

Fonte: Autor.

4.3.1 Quantificação/detecção do EE2 nas amostras ambientais

As amostras foram classificadas como “detectado” quando apresentaram valores médios das triplicatas acima do respectivo limite de detecção referente à estação de coleta. Dos ambientes testados, somente no Rio Capivari as concentrações de EE2 foram encontradas em concentração acima do LOQ do método. Nos pontos da foz do Rio Sangradouro e no Riozinho do Campeche, o hormônio foi detectado em ambas estações. Todavia, contrariando as expectativas, o EE2 não foi detectado em amostras de água coletadas no verão e no outono junto ao Rio do Brás. Em ambientes marinhos como as praias dos Ingleses ou Canasvieiras, o hormônio não foi detectado. Já para ambientes lagunares, e.g., Lagoa do Peri e a Lagoa da Conceição, o hormônio foi detectado somente no verão (

Tabela 6).

Tabela 6: Concentração de EE2 (ng/L) em amostras de águas do mar e metadados: estação do ano, salinidade, coliformes fecais, balneabilidade e região geográfica, referente aos pontos de coleta na ilha de Florianópolis.

Amostras	EE2 (ng/L)	Região	n > LOD, n=3	S%	Coliformes (NMP/100ml)	Balneabilidade
Ing_sum	< LOD _v	Norte	0	35	331	Própria
Cap_sum	0,12	Norte	3	6	24.196	Imprópria
Cap_aut	0,09	Norte	3	5	161	Imprópria
Can_sum	< LOD _v	Norte	0	33	31	Própria
Bras_sum	< LOD _v	Norte	0	5	NA	NA
Bras_aut	< LOD _o	Norte	0	1	NA	NA
LCon_sum	Detect., < 0,12	Leste	3	30	12.033	Imprópria
LCon_aut	< LOD _o	Leste	1	22	243	Própria
Sang_sum	Detect., < 0,12	Sul	2	8	6.488	Imprópria
Sang_aut	Detect., < 0,04	Sul	3	1	10.462	Imprópria
Rioz_sum	Detect., < 0,12	Sul	1	1	345	Própria
Rioz_aut	Detect., < 0,04	Sul	3	4.5	4.611	Imprópria
Peri_sum	Detect., < 0,12	Sul	2	1	10	Própria
Peri_aut	< LOD _o	Sul	0	1	10	Própria

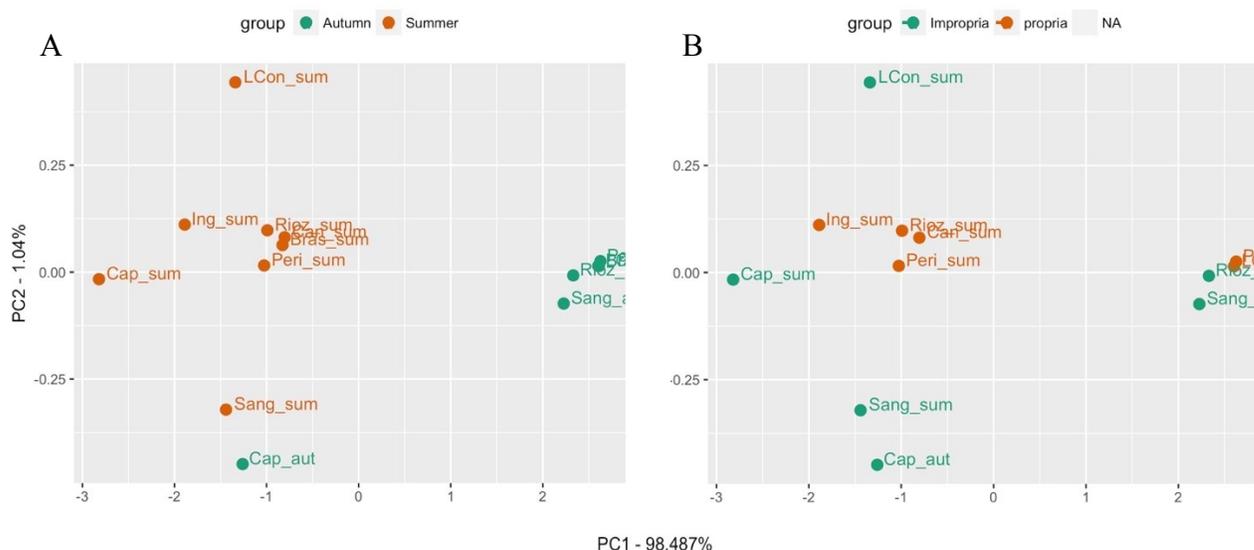
Fonte: Autor (informações de balneabilidade e coliformes fecais compilados da página oficial do Instituto do Meio Ambiente do governo de Santa Catarina (IMA, 2018; IMA, 2019).

LOD_v = limite de detecção da amostragem de verão (0,0919 ng/L); LOD_o = limite de detecção da amostragem de outono (0,0306 ng/L); Detect. = amostras que apresentaram concentrações acima de LOD_v ou LOD_o, no verão ou outono, mas ainda abaixo dos respectivos limites de quantificação (0,1217 ou 0,0405 ng/L); NA = não avaliado.

A análise de componentes principais (PCA) foi aplicada ao conjunto de dados de concentração estimada do EE2 nas amostras de água, mesmo para aquelas onde o estrógeno não foi quantificado, sendo que para estas os valores de concentração utilizados foram considerados como concentração hipotética, uma vez que encontravam-se abaixo do LOQ respectivo de cada estação. A PCA (Figura 7) objetivou detectar padrões de agrupamentos de amostras, em função de seus conteúdos de EE2. Em princípio, assumiu-se como plausível a hipótese de que os teores de EE2 tendem a ser mais elevados no período do verão, sendo que todos os pontos com

balneabilidade classificada como imprópria apontaram a presença do hormônio no presente estudo. Para as análises multivariadas foram utilizados os valores estimados como concentração hipotética, uma vez que parte das concentrações utilizadas estavam abaixo do limite de quantificação.

Figura 7: Análise de componentes principais para (A) estações do ano e (B) balneabilidade.



Fonte: Autor.

Confirmando o resultado da análise de componentes principais (Figura 7-A), o teste pareado não paramétrico de Wilcoxon revelou a existência de diferenças de conteúdos de EE2 entre as amostras de verão e de outono ($p < 0,05$). Todavia, não foram detectadas discrepâncias relevantes ($p > 0,05$) entre as amostras quando considerada a balneabilidade, ou as combinações de pares referentes à região de amostragem (norte, sul e leste, Florianópolis-SC).

Não foram encontrados indícios de bioacumulação, ou presença do EE2 em tecidos algais, porém, o fator de concentração considerado neste ensaio para esses organismos foi muito baixo para uma afirmativa conclusiva.

4.4 DISCUSSÃO

Em relação à sensibilidade do método de imunoenensaio utilizado à análise de EE2 nas amostras de águas, os valores estimados para LOQ e LOD após a concentração do analito foram satisfatórios e assemelham-se aos relatados na literatura para ambientes naturais (BARREIROS et

al., 2016). De fato, o método apresenta a vantagem de ser bastante sensível, específico (baixa reatividade cruzada ou interferência com análogos) e prático, não requerendo derivatização prévia do analito para sua quantificação (MANICKUM; JOHN, 2015).

Apesar de sensível, o método imuno-analítico escolhido à quantificação do EE2 é normalmente destinado às áreas de saúde e ainda pouco utilizado para matrizes ambientais. Na África do Sul, o método de teste ELISA é comumente usado para triagem e quantificação de hormônios esteroides no ambiente, mas o uso de técnicas químicas como as cromatografias gasosa ou líquida, acopladas à espectrometria de massas (GC/MS ou LC-MS, respectivamente) ainda são preferidas em estudos internacionais que buscam monitorar a contaminação ambiental por estrógenos (BARREIROS et al., 2016; MANICKUM; JOHN, 2015) Mesmo podendo apresentar baixo custo e potencial para ampla aplicação, maior atenção deverá ser dispendida no uso de kits de teste ELISA comerciais não desenvolvidos para análises em amostras ambientais, em função da especificidade do ensaio e a potencial interferência de fatores como ácidos húmicos, salinidade (força iônica), e pH (URAIPOONG et al., 2017), por exemplo.

Para diminuir a ação do sal em amostras aquosas deste estudo, após a fase de concentração do analito por meio de SPE, a fase estacionária foi eluída com água destilada. Nas amostras algais, a escolha da extração em duas fases (metanol: água e acetato de etila) objetivou reduzir a concentração de outros compostos do metabolismo algal que pudessem interferir negativamente na recuperação do analito de interesse, i.e., *clean-up*.

4.4.1 Ocorrência de EE2 em amostras de água de ambientes costeiros

Considerando os resultados obtidos entre os diferentes ambientes amostrados, observa-se que ambientes lacustres e fluviais são os mais vulneráveis à contaminação por EE2 que ambientes marinhos, quer pela proximidade da fonte poluidora, quer pelas características físico-químicas dos respectivos ambientes como discutido a seguir.

4.4.1.1 EE2 na foz dos rios Capivari, Brás, Riozinho do Campeche e Sangradouro

Os locais amostrados são massivamente utilizados por banhistas, principalmente no verão, salvo os pontos do Riozinho do Campeche, Rio Capivari, Rio do Brás. No entanto, apesar de não

haver o uso direto das águas desses rios por parte dos banhistas, as fozes dos três rios localizam-se em praias turísticas e com alta fluxo de visitantes. O Riozinho do Campeche deságua na praia do Campeche, enquanto aquelas dos rios Capivari e do Brás nas praias de Ingleses e Canasvieiras, respectivamente. O Rio do Brás não apresenta ligação direta com a água da praia durante a maior parte do ano, mas pode abrir o canal naturalmente em períodos de elevada precipitação pluviométrica. Além disto, o canal, por vezes, é aberto propositadamente para evitar alagamentos em áreas circunvizinhas. O Rio Sangradouro também tem sua foz localizada em uma praia turística de Florianópolis, a praia do Matadeiro, mas, diferentemente dos demais rios amostrados, é comum avistar banhistas naquelas águas, sendo o único canal que conecta as água da Lagoa do Peri ao mar (Figura 8, FERREIRA, 2015)

Figura 8: Foz do Rio Sangradouro após as 16h no verão. A imagem apresenta o ponto de coleta do Rio Sangradouro e destaca considerável número de visitantes banhando-se em suas águas mesmo em dia parcialmente nublado.



Fonte: Autor.

Dos ambientes amostrados, somente o Rio Capivari apresentou valores acima dos limites de quantificação (LOQ). Os valores estimados no verão (0,12 ng/L) foram mais altos comparativamente aos do outono (0,09 ng/L), mas ainda considerados baixos se comparados a ambientes fluviais de zonas costeiras impactadas por atividades antrópicas reportados em outros países (Anexo C). Ribeiro e colaboradores (2009) reportam teores de 56 ng EE2/L em ponto amostral mais próximo à foz do Rio Douro, à margem da cidade do Porto (Portugal). Na Alemanha, Beck e colaboradores (2005) detectaram concentrações médias de 3,0 a 17,2 ng/L na parte interna da baía de Wismar. Em estuários dos Estados Unidos e China foram reportados valores semelhantes, i.e., rio Acushnet (Massachusetts - 1,3 - 4,2 ng/L) e rio Pearl (Guangdong - 3,01-4,67

ng/L), respectivamente (XU et al., 2014; ZUO; ZHANG; DENG, 2006). O aumento da salinidade também favorece a deposição deste composto junto aos sedimentos (LAI et al., 2000).

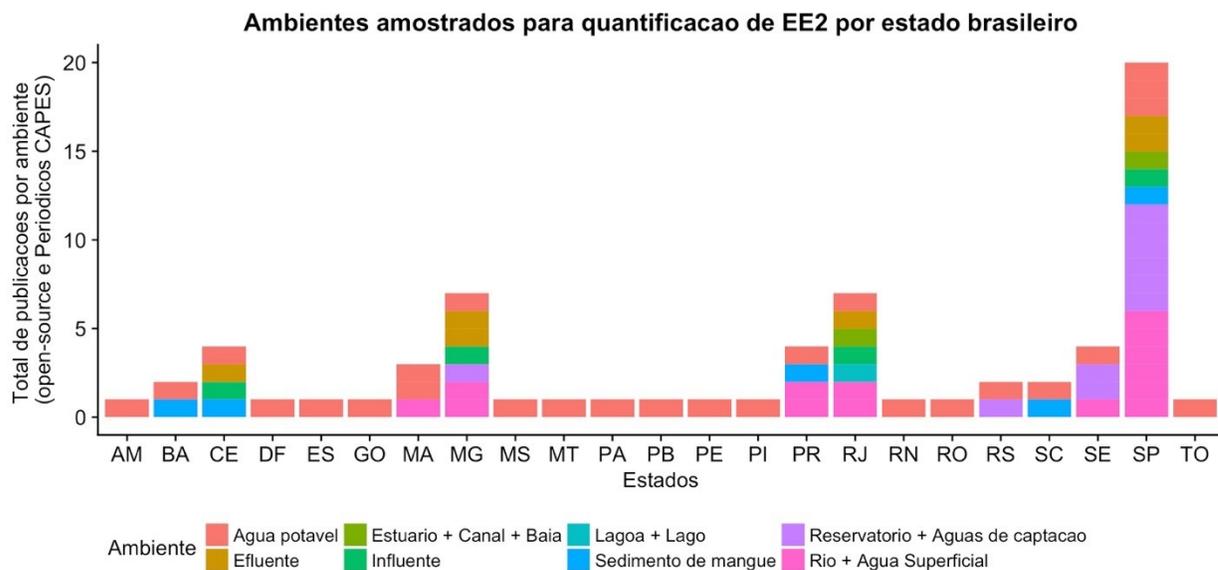
No Brasil, estudos visando a identificação de EE2 em águas costeiras nos estuários dos estados de São Paulo e Rio de Janeiro (DALAGO SALGADO et al., 2019; KUSTER et al., 2009 – Figura 9) revelaram resultados negativos quanto à detecção daquele xenobiótico. De outra forma, amostras de sedimentos coletadas em áreas de manguezais demonstraram a existência de valores bastante amplos de concentração de EE2: 2,22 ng/g - Guaratuba/PR (FROEHNER et al., 2012), 86,3 ng/g - Santos/SP (PUSCEDDU et al., 2019) e 129,78 ng/g – Salvador/BA (FROEHNER et al., 2012). Froehner e colaboradores (2012), também identificaram o hormônio no sedimento da manguezal do Itacorubi, localizado na ilha de Santa Catarina, com valor acima que o encontrado neste estudo. No entanto, é esperado que amostras de sedimento em ambientes urbanos ricos em matéria orgânica apresentem teores elevados de EE2, dado o maior tempo de meia-vida do composto em relação ao observado na fase aquosa e à rápida sorção deste composto a sedimentos ricos em carbono orgânico, como é o caso de manguezais (GIMILIANI; FONTES; ABESSA, 2016; LAI et al., 2000).

Mesmo não sendo esperada a ocorrência de EE2 em ambientes estuarinos distantes de fontes diretas de efluentes, cabe salientar que as baixas concentrações detectadas neste estudo podem estar relacionadas à fração do estrógeno que está sendo considerada no teste ELISA. O kit comercial comprado deveria reconhecer tanto a fração livre, como o OVA-etinilestradiol, mas após observar os resultados e em comunicação pessoal com o fabricante, foi observado que somente a fração livre foi contemplada.

O engano por parte do fabricante foi evidenciado com os ensaios para calcular a eficiência do processo de extração realizado concomitantemente ao teste de quantificação do EE2 na amostras, no qual, o padrão de EE2 (Sigma-Aldrich, EUA) foi adicionado em diferentes concentrações (250; 740; e 2.200 ng/L) a 1,5 L de água do mar filtrada (0,45 μm), seguido do processo de concentração e ressolubilização do analito (2,5 ml - PBS) conforme protocolo adotado para as amostras. As mesmas concentrações foram adicionadas diretamente a 2,5 ml de PBS. As duas curvas simuladas com o padrão de EE2 foram processadas junto às amostras conforme a orientação do kit. Os resultados dos experimentos foram negativos, mesmo nas concentrações mais altas de EE2. Atenciosamente, o lote utilizado neste ensaio foi testado também pelo fabricante

(*Cloud-Clone Corp* – CCC, USA) que confirmou que somente a fração conjugada estava sendo medida.

Figura 9: Número total de referências da literatura para ambientes amostrais no Brasil, onde estudos de identificação de EE2 em matrizes aquosas e de sedimentos foram conduzidos. Como alguns estudos realizaram análises em mais de um ambiente, o somatório de referências ultrapassa o número de publicações consultadas.



Fonte: Autor.

Apesar da excreção via urina do EE2 ser majoritariamente na sua forma conjugada (KOH et al., 2008), a ação de micro-organismos em estações de tratamento de esgotos (ETA), ou no ambiente natural, pode promover a clivagem dos grupamentos sulfato ou glucuronídeo associados ao hormônio, convertendo-o a sua forma livre e mais estável. Estima-se que em locais com maior concentração de nutrientes, e conseqüentemente maior atividade microbiana, a proporção entre as formas de EE2 livre e conjugado aumente consideravelmente (GABET-GIRAUD et al., 2010; GENTILI et al., 2002). Os ambientes fluviais selecionados neste estudo são sistemas impactados pelas atividades urbanas ao longo dos anos, sendo recorrentes as reclamações de moradores por causa do forte cheiro proveniente desses ambientes (NSC TOTAL, 2017, 2018), os quais ainda recebem o aporte de despejos irregulares de esgoto doméstico (FLORIANÓPOLIS, 2019a, 2019b). Este cenário reforça a suposição de que a concentração estimada não corresponda ao total de EE2 presente nos pontos amostrais, dada a sua ocorrência na forma livre.

O rio do Brás foi o único ambiente fluvial onde o EE2 não foi quantificado ou detectado. O motivo pode ser a instalação da Unidade de Recuperação Ambiental (URA) de responsabilidade da CASAN (Companhia Catarinense de Águas e Saneamento), ativa desde 2016. A URA encontra-se instalada no Sapiens Park, onde é realizado o processo de clarificação e purificação da água captada do rio. Cerca de 700 mil litros/dia são filtrados e passam por tratamento de flotação e desinfecção por ultra violeta antes de retornarem ao rio (ARESC, 2017). De acordo com a CASAN (2018), o nível de coliformes diminuiu de 48.500 NMP/100ml em 2016, para 4.900 NMP/100ml em 2018. O relatório disponibilizado pela ARESC (Agência de Regulação de Serviços Públicos de Santa Catarina) confirmam essa tendência de queda dos valores de coliformes após a instalação da URA com resultados do monitoramento quinzenal de setembro a dezembro de vários pontos do rio do Brás no ano de 2017, mas observam a variação dos parâmetros coletados para a estimativa da qualidade da água variam com a sazonalidade de ocupação do entorno (ARESC, 2017). Sabendo que o etinilestradiol é prontamente destruído pela exposição a raios ultravioleta ($\lambda = 254$, LIU; WU; DENG, 2003), as chances de detecção do hormônio no Rio do Brás em relação aos demais ambientes é realmente minimizada mediante o processo de tratamento realizado nas águas do rio.

4.4.1.2 Ausência do EE2 em ambiente marinho (praias de Canasvieiras e Ingleses)

A não identificação do hormônio em águas marinhas não surpreende. Com a distância da fonte poluidora, aumenta a diluição desses compostos, seja durante o percurso fluvial, após receber águas pluviais ou no encontro com o grande volume de água no ambiente marinho (ATKINSON; ATKINSON; TARRANT, 2003). Deve-se considerar ainda, que em ambientes mais salinos, aumenta-se a adsorção dos estrógenos presentes a sedimentos ou matéria orgânica em suspensão, enquanto a solubilidade desses compostos diminui, reduzindo ainda mais a probabilidade de detecção do xenobiótico. Yang, Cheng e Lin (2016) observaram o efeito *salting-out* de EDCs e relataram a correlação negativa entre salinidade e os teores de EDCs dissolvidos, bem como a correlação positiva entre salinidade e o coeficiente distribuição (*partition distribution*). Tanto a distância da fonte como fator crescente de diluição em direção ao ambiente marinho, como o aumento da salinidade são fatores que diminuem as chances de detecção de EE2 em suspensão na água do mar. Os poucos trabalhos que reportam a quantificação do estrógeno sintético em

ambientes costeiros abertos, além de ambientes estuarinos, destacam a presença do descarte de efluentes diretamente na praia, como observado em praias populares de Portugal na próximas à desembocadura do rio do Porto: Leça da Palmeira e Matosinhos, com médias de 2,8 e 2,1 ng/L, respectivamente (GC-MS, ROCHA et al., 2012), ou ainda na Austrália: Werribee, com média de 0,31 ng/L, sendo que em Werribee, efluentes da ETA de Melbourne são despejados na baía (Kit ELISA, FERGUSON et al., 2013).

Até este momento não foram encontradas publicações em revistas *open-access* ou na base de Periódicos CAPES que tenha quantificado o EE2 em amostras de água em ambiente marinho aberto, como praias ou mar aberto no Brasil. A menor atenção dada a esses ambientes, no entanto, não é exclusiva de regiões costeiras brasileiras. Em extensiva revisão sobre a análise de estrógenos em matrizes ambientais, Barreiros e colaboradores (2016) destacam que a maioria dos estudos publicados, nacional ou internacionalmente, realizaram a determinação de estrógenos em amostras aquosas de efluentes e águas superficiais.

4.4.1.3 EE2 em ambientes lacustres (Lagoa do Peri e Lagoa da Conceição)

Tanto na Lagoa do Peri como na Lagoa da Conceição foram detectadas concentrações de EE2 abaixo do limite de quantificação, somente durante a amostragem de verão, não tendo sido detectado no outono. As lagoas são bastante visitadas por turistas durante o ano, mas em períodos de temporada o número de visitantes na ilha aumenta consideravelmente, o que corrobora o resultado encontrado. No entanto, enquanto a Lagoa da Conceição é circundada por áreas urbanizadas entre paisagens naturais e apresenta relatos da introdução de esgotos domésticos (CASAN, 2014a, 2014b; FONSECA; BRAGA; EICHLER, 2002; SANTIAGO et al., 2001) a Lagoa do Peri está inserida na área protegida do Parque Municipal da Lagoa do Peri criado em 1981 (FLORIANÓPOLIS, 1981). A referida lagoa é o maior manancial de água doce da ilha de Florianópolis e abastece parte da população do sul e leste da Ilha de Florianópolis (SANTOS et al., 1989). Apesar de ser uma lagoa costeira, a Lagoa do Peri não sofre influência marinha direta por encontrar-se elevada em relação ao nível do mar (FERREIRA, 2015; HENNEMANN; PETRUCIO, 2011; IMA, 2018, 2019), diferente da Lagoa da Conceição que apresenta variação de salinidade em função da maré, predominância de ventos (intensidade e quadrante), evaporação e

volume pluviométrico, por exemplo, além deste parâmetro não ser espacialmente homogêneo na lagoa (FONSECA; BRAGA; EICHLER, 2002).

A detecção do EE2 na Lagoa do Peri pode causar alguma estranheza, no entanto, há certas características da visitação aquele local que devem ser levadas em consideração. Apesar de ser utilizada como captação de água para abastecimento, a lagoa é frequentada por banhistas durante todo o ano, atividade que se intensifica no verão. Possui área superficial de 5,2 km² e profundidade de até 11,0 m (SANTOS et al., 1989), porém a visitação à lagoa dá-se de forma bastante concentrada, com os banhistas localizados na pequena faixa de areia em frente à sede do Parque (Figura 10). Além disso, deve-se considerar que mesmo sendo estimados os valores de nitrogênio e fósforo em alguns pontos, a balneabilidade dá-se principalmente pela presença ou ausência de *Escherichia coli* em conformidade com a Resolução CONAMA nº 274/2000. Das análises de balneabilidade realizadas pelo Instituto do Meio Ambiente (IMA, 2018, 2019) nos os últimos 3 anos, a Lagoa da Conceição foi classificada como “própria” em apenas 16% das amostragens quinzenais de verão (21 de dezembro a 20 de março) e 56% das amostragens mensais de outono (20 de março a 21 de junho), enquanto para a Lagoa do Peri em 100% das amostragens durante o verão obteve-se a classificação “própria”, com redução deste valor para 89% no outono.

Figura 10: Arco praias direito da Lagoa do Peri. A imagem ilustra o fim de tarde (~ 18h) no ponto amostral durante o verão, com expressivo número de banhistas.



Fonte: Autor.

As coletas de amostras neste estudo ocorreram ao fim da tarde, após um dia de sol pleno e altas temperaturas. A presença do etinilestradiol, neste caso, não provém da introdução de recorrente de esgotos irregulares, não podendo ser relacionada ao grau de poluição fecal, como normalmente é feito com a contagem de coliformes fecais. A hipótese gerada a partir dos resultados

encontrados é de que o EE2 detectado na água da Lagoa do Peri tem origem na urina dos banhistas que porventura façam uso de contraceptivo oral. Acredita-se que, caso a determinação distinta de EE2 livre e EE2 conjugado fosse realizada, o ponto amostral da Lagoa do Peri seria o único onde a concentração do estrógeno conjugado seria maior em relação a sua forma livre.

A princípio, as concentrações detectadas do EE2 neste cenário ($< 0,12$ ng/L) não devem causar alarde entre os usuários do Parque ou consumidores da água proveniente da lagoa. O estrógeno acumulado na água ao longo do dia, muito provavelmente, é dissipado na lagoa tão logo a visita se encerre e dificilmente seria detectado se a amostragem tivesse sido conduzida pela manhã. Ainda assim, sua detecção não deveria ser ignorada, pois assim como o excesso de visitantes insere elementos estrógenos artificiais em um ambiente destinado ao abastecimento de água para uso humano, outros componentes tão persistentes, ou mais, também podem estar sendo inseridos, como é o caso de resíduos de protetor solar e outros fármacos ou EDCs utilizados pelos banhistas. A solução deste problema poderá considerar a adoção de medidas que limitem o número máximo de visitantes/dia, a proibição do uso de protetor solar nas dependências do parque e conscientização dos visitantes a não urinarem dentro da lagoa, mas utilizarem as instalações sanitárias do parque.

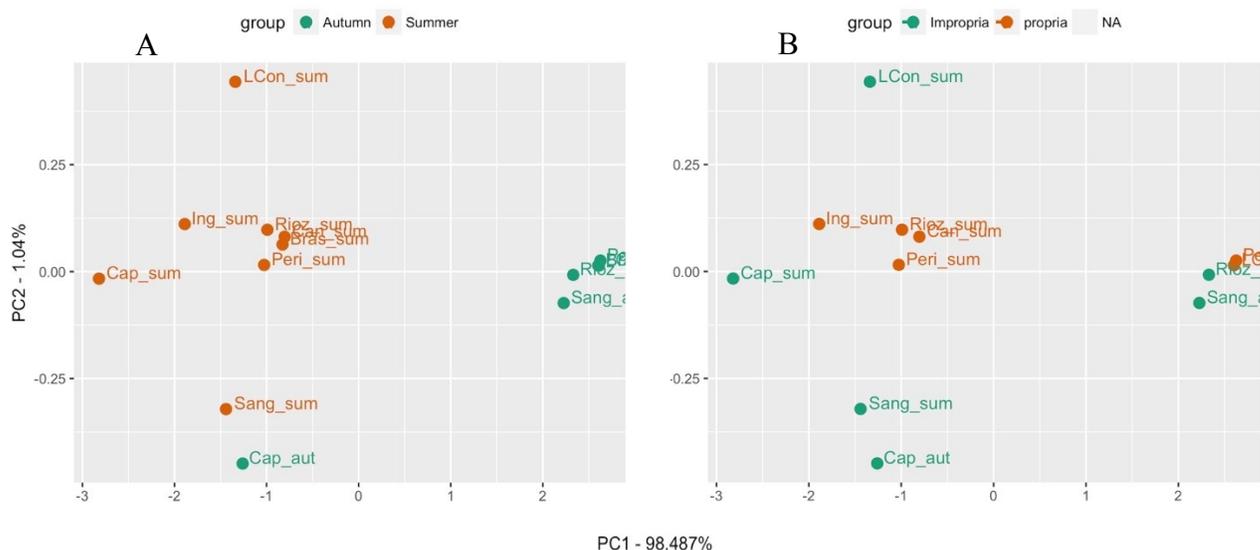
4.4.1.4 Correlação dos resultados com fatores ambientais

A diferença encontrada entre as populações de amostras entre as diferentes estações amostradas parece estar relacionada à tendência de terem sido apontadas maiores concentrações de EE2 no verão. A diferença significativa apontada pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon entre elas pode ser observada na formação de pelo menos dois grupos distintos na análise dos componentes principais (Figura 11). O ponto amostral do Rio Capivari no outono (Cap_aut) é o único que ficou agrupado junto às amostras de verão, sendo a única amostra de outono com teores de EE2 acima do LOQ, com mais de duas vezes o limite de quantificação da estação ($0,09$ ng/L, $LOQ = 0,04$ ng/L).

A distribuição das amostras no modelo de classificação adotado, todavia, não revelou diferenças significativas em relação à condição de balneabilidade dos pontos de coleta. Além disto, o critério de contagem de coliformes fecais correntemente adotado como indicativo daquela condição, não correlacionou-se diretamente com os teores de EE2 observados (Tabela 6). Variáveis

como a salinidade das amostras ou a sua localização de coleta (norte, sul e leste da ilha de Florianópolis) também não foram determinantes na distribuição das amostras na PCA.

Figura 11: Análise de componentes principais para (A) estações do ano e (B) balneabilidade.



Fonte: Autor.

4.4.2 Análise do EE2 em tecidos algais

As amostras de biomassa algal foram coletadas somente no verão, na foz do Rio Sangradouro, onde o EE2 foi detectado abaixo do limite de quantificação ($LOQ_v < 0,12$ ng/L) e nas praias de Canasvieiras e Ingleses, aonde o analito não foi detectado na água ($LOD_v < 0,9$ ng/L). Desta forma, a detecção do hormônio nas algas só ocorreria caso houvesse um alto índice de bioacumulação em suas células.

Apesar de até então não terem sido reportados estudos que indiquem a biotransformação e/ou bioacumulação de EE2 em macroalgas, alguns autores consideram a possibilidade de ocorrência destes processos em espécies de microalgas e plantas vasculares (ADEEL et al., 2017). A capacidade das algas em biotransformar e/ou bioacumular o EE2 é bastante distinta para cada espécie e a eficiência alcançada parece depender da concentração do estrógeno e de certos nutrientes disponíveis no meio (Tabela 4).

Xie e colaboradores (2015) realizaram pesquisa sobre a bioacumulação de estrógenos e sua biomagnificação trófica no lago Taihu (China). Os autores detectaram EE2 no fito e no zooplâncton e estimaram o teor do estrógeno nas algas resultante de bioacumulação, com valores de 69 L/kg e 217 L/kg, respectivamente calculados a partir do fator de bioacumulação (BAF), sendo a equação (2) utilizada pelos autores apresentada abaixo. Num segundo trabalho, aqueles autores não detectaram EE2 no fitoplâncton amostrado do mesmo lago, ainda que o estrógeno tenha sido detectado na água com valores máximos de 8,3 ng/L (XIE et al., 2017).

$$BAF = \frac{\text{concentração do fármaco na espécie aquática (peso seco)}}{\text{concentração do fármaco na água}} \quad (2)$$

Em experimento *in vitro*, Maes e colaboradores (2014) observaram bioacumulação em *Desmodesmus subspicatus* de até 145 Bq/mg (peso seco alga), sendo que 23% do EE2 no meio foi assimilado nas primeiras 24h. Os autores também identificaram processos de biotransformação e eliminação do EE2 assimilado. A concentração inicial utilizada nos ensaios foi de 27 µg 14C-EE2/L (48 e 72 h), valor muito acima do esperado encontrar em quaisquer ambientes naturais, sendo que a biotransformação em EE2 brominado por *D. subspicatus* só ocorreu quando o brometo estava disponível no meio de cultura. Lai, Scrimshaw e Lester (2002) encontraram pouca ou nenhuma remoção significativa do EE2 do meio de cultivo pela microalga *Chlorella vulgaris*, após a exposição ao estrógeno em concentração de 2,5 µg/L.

Outros estudos com espécies de microalgas também obtiveram resultados negativos à bioacumulação de EE2. Shi e colaboradores (2010) observaram a remoção do estrógeno em efluentes sintéticos (E2 + EE2, 1 µg/L), estimando em 87% a eficiência do xenobiótico por um conjunto de seis microalgas (*Anabaena cylindrica*, *Chlorococcus*, *Spirulina platensis*, *Chlorella*, *Scenedesmus quadricauda* e *Anaebena* var.), ao longo de 6 dias. Os autores atribuíram a remoção do hormônio ao rápido processo de adsorção do composto às algas já nos primeiros minutos de experimento, o que facilitaria a sua posterior biotransformação.

Considerando o método de extração adotado, o efeito *salting-out* observado por Yang, Cheng e Lin (2016) pode ser também co-responsável pela não identificação de EE2 nos tecidos algais, em função da concentração de NaCl presente na etapa de extração. Neste caso, a adição de sal para forçar a separação em diferentes fases do solventes pode ter promovido a precipitação do

estrógeno, cujo descarte junto a fase aquosa metanol: água (v/v) poderá ter ocorrido em alguma extensão. Mesmo nos experimentos nos quais a alga fora exposta ao hormônio, os resultados foram negativos para a detecção do analito. A hipótese mais aceitável à explicação deste resultado considera que a quantidade de biomassa algal utilizada tenha sido insuficiente, especialmente considerando-se a baixa concentração de EE2 detectada na água.

A disponibilidade de dados quantitativos ou analíticos sobre a identificação de EDCs em macroalgas é ainda bastante limitada. O único trabalho de quantificação de EE2 em macroalgas (ÁLVAREZ-MUÑOZ et al., 2015) realizou extração líquida pressurizada (PLE), à 60°C, tendo acetonitrila e tampão citrato (1: 1, v/v) como solventes. Após a secagem, o extrato foi redissolvido (100 mL, água padrão HPLC), seguido de separação em fase sólida (SPE). Os autores utilizaram as macroalgas *Saccharina latissima* e *Laminaria digitata* e reportaram resultados negativos à identificação do EE2 (LOQ = 1,80 – 2,44 ng/g), mas não deixam claro a concentração de EE2 na água ou a massa seca utilizada à extração dos compostos. Assim, entende-se como importante a realização de ensaios futuros para aprimorar o método de extração do hormônio nas algas e diminuir a presença de outros analitos provenientes do metabolismo destas que possam prejudicar a fase analítica.

4.5 CONCLUSÃO

Neste capítulo, a presença de EE2 foi investigada em diferentes ambientes da Ilha de Florianópolis, considerando amostras de água e de alga (*Ulva* spp.). Das amostras de água, somente no Rio Capivari a concentração do hormônio foi encontrada acima dos limites de detecção nas duas estações amostradas

Mesmo tendo sido considerada apenas a fração conjugada de EE2 neste ensaio, os valores encontrados no Rio Capivari no verão já encontram-se acima dos limites considerados como concentração de não efeito (PNEC) de 0,1 ng/L proposto por Caldwell e colaboradores (2012) para peixes. O valor de PNEC foi baseado em estudos de toxicidade de longa duração, excedendo meio ano (180 d) em vários casos no ambiente aquático e, como estudo de avaliação de risco aquático, deve ser usado se a carga hormonal presente na água for maior que o PNEC por período equiparável.

Caso a fração de estrógenos livres não contemplada neste estudo seja realmente maior que a fração conjugada estimada em ambientes com alta carga microbológica (podendo chegar a mais de 90% do total em efluentes, GABET-GIRAUD et al., 2010), como é o caso do Rio Capivari, Rio Sangradouro, Riozinho do Campeche e Lagoa da Conceição o número de amostras acima do PNEC deve aumentar em quaisquer das estações consideradas neste ensaio.

Sendo este o primeiro estudo a realizar a identificação desse composto na fase aquosa em ambientes costeiros de Florianópolis, o monitoramento de estrógenos nessas áreas é recomendada para o entendimento do real risco da presença desse composto em nossas águas.

O hormônio EE2 não foi identificado nos tecidos algais amostrados. Ensaio que estabeleçam métodos de extração do hormônio nos tecidos de macroalgas de forma mais eficiente e livre do excesso de metabólitos característicos da própria alga são recomendados.

5 CAPÍTULO II – *ULVA LACTUCA* EXPOSTA AO EE2

Neste capítulo encontra-se a comparação dos perfis metabólicos determinados por espectrofotometria UV-visível e cromatografia líquida de alta eficiência.

5.1 INTRODUÇÃO

Metabólitos são moléculas de baixo peso molecular (<1000 Da), necessários à fisiologia e ao desenvolvimento celular (FIEHN, 2001; PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012; VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006). Por participarem dos processos catalíticos e regulatórios celulares, os metabólitos servem como uma assinatura das atividades bioquímicas relacionadas ao fenótipo do indivíduo e proporcionam um panorama do seu estado celular em um dado momento (GUPTA et al., 2013; PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012).

De modo geral, o perfil de metabólitos secundários de dado organismo é função da interação deste com os fatores (a)bióticos, de modo que a biossíntese e o acúmulo de dado composto respondem aos diferentes estímulos do meio (MASCHEK; BAKER, 2008; SCHMITT; HAY; LINDQUIST, 1995). Neste sentido, o ambiente marinho proporciona um amplo leque de condições físico-químicas que podem estimular ou suprimir a produção de metabólitos secundários. Além das diferenças de temperatura, incidência luminosa, ou regimes pluviais que podem aumentar ou diminuir latitudinalmente, os oceanos apresentam ainda uma série de fatores físico-químicos que variam também com a profundidade (luminosidade, movimentação da água, temperatura, densidade da água, pressão, entre outros). Outros fatores também são fontes importantes de variações ambientais naturais, dentre os quais pode-se citar: o posicionamento da costa, aportes fluviais, velocidade e direção de ventos e ondulações, amplitude das marés, presença ou ausência de termoclina, correntes profundas e tipos de substrato, além das interações bióticas.

Neste contexto, a metabolômica ambiental objetiva avaliar os efeitos de contaminantes no ambiente natural, a partir da determinação de alterações da composição e concentração de metabólitos de um dado organismo (LANKADURAI; NAGATO; SIMPSON, 2013; PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012). O uso de espécies algais como bioindicadoras da poluição aquática é observado em relação a diversos contaminantes. Do ponto de vista fisiológico, os danos causados

ao aparato fotossintético são frequentemente considerados, por ser este processo sensível aos efeitos de xenobióticos no organismo (ALAHVERDI; SAVABIEASFAHANI, 2012; PETSAS; VAGI, 2017). Bioquimicamente, a produção de ROS, o perfil de ácidos graxos e a determinação da atividade enzimática (lipoxigenase – LOX), por exemplo, são variáveis apontadas como biomarcadores da poluição por metais pesados em algas marinhas como *Ulva lactuca* (KUMAR et al., 2010).

Espécies do gênero *Ulva* (divisão Chlorophyta) têm sido consideradas como indicadoras da contaminação de ambientes aquáticos por metais pesados (BOUBONARI; MALEA; KEVREKIDIS, 2008; CHAUDHURI et al., 2007; KUMAR et al., 2010) e, ainda que menos frequente, por outros poluentes como formalina, TBTO (óxido de tributilestanho) (HAN et al., 2008; HAN; CHOI, 2005) e hidrocarbonetos como gasolina e diesel (PILATTI et al., 2016; RAMLOV et al., 2013). Espécies desse gênero são consideradas cosmopolitas e podem ser encontradas em ambientes marinhos rasos de diversos países, muitas vezes dominantes em costões rochosos da zona inter ou submareal (KIRKENDALE; SAUNDERS; WINBERG, 2013), ou mesmo como os principais representantes em grandes florações (WAN et al., 2017). Tais espécies apresentam grande plasticidade ambiental, facilitando seu uso em estudos de biomonitoramento ambiental.

O acúmulo de poluentes como metais pesados por espécies do gênero *Ulva* encontra-se bem caracterizado na literatura, todavia, informações sobre os efeitos de xenobióticos pouco solúveis em água ainda são limitadas. Assim, o presente capítulo objetivou detectar possíveis alterações no perfil metabólico de *Ulva lactuca* mediante exposição *in vitro* ao estrógeno 17 α -etinilestradiol.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Para as análises e discussão deste capítulo, foi utilizado o modelo experimental 1, conforme descrito a seguir. Este mesmo modelo experimental será discutido no capítulo subsequente a partir de outra abordagem analítica junto ao modelo experimental 2. No presente capítulo, apenas o endometanoloma da alga *Ulva lactuca* foi abordado.

Nesse primeiro modelo, o experimento foi realizado utilizando fragmentos do talo de *Ulva lactuca*, cultivados em *in vitro* em meio com salinidade 35‰. Cada réplica experimental foi

constituída por 5 discos de talos (8 mm ϕ , $0,7 \pm 0,05$ mg de peso seco), cultivados em erlenmeyers (125 ml) contendo 100 ml de água do mar filtrada (20 micra), enriquecida com meio Provasoli (25%, COELHO et al., 2012). Os experimentos foram iniciados no segundo dia de cultivo dos discos, os quais foram mantidos nas mesmas condições em que foram aclimatados (fotoperíodo de 12h:12h, aeração ininterrupta e temperatura a 23 ± 3 °C). As algas foram expostas a 1 mg/L de EE2 (98% pureza, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), por 48h, sendo retirada uma triplicada (i.e., 24 discos) no tempo 0h e outra após 48h de exposição. Como controle, foram considerados meios de cultura: i) sem adição de EE2, mas com 0,05% de etanol p.a. (v/v - concentração final do solvente adicionada à solução estoque nos tratamentos) e ii) sem adição de EE2 e sem etanol.

5.2.1 Amostragem e extração

Em cada momento amostral (0 e 48h) foram retiradas triplicatas de cada tratamento, seguido de rápido enxague da biomassa em solução de formiato de amônio 0,5 M, a temperatura inferior à 4 °C. As amostras foram rinsadas com água destilada gelada, imersas em nitrogênio líquido, transferidas a freezer -80 °C, liofilizadas e armazenadas a -20 °C até o momento da extração.

A extração da biomassa algal utilizou 0,02 g (massa seca) e 4,5 mL de etanol 70%, adicionado de ribitol (200 mg/L, pureza $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich – MO, USA). O ribitol foi adicionado como padrão interno (ALSUFYANI et al., 2017) na perspectiva de análises futuras dos extratos com cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. A biomassa foi macerada em *ependorf*, com auxílio de bastão de vidro de ponta cônica esmerilhada e nitrogênio líquido. Após a adição do solvente, a mistura foi exposta ao ultrassom (2,4 GHz) por 20 min, incubada em ausência de luz, a 4°C, por 2h, e centrifugada (10 min, 4000 rpm). Uma alíquota do sobrenadante foi coletada (3 mL), liofilizada e conservada a -20°C até posterior análise por ressonância magnética nuclear (RMN,) junto ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBIO/CNPEM - Campinas, SP). O sobrenadante remanescente foi transferido para freezer -80°C até a realização das análises cromatográficas, de espectrometria de massas e de espectrofotometria UV-visível.

5.2.2 Ferramentas quimiométricas

Os extratos hidroalcoólicos de *U. lactuca* acima referidos foram primeiramente analisados quanto ao perfil do endometaboloma (janela espectral de 350 a 750 nm) em espectrofotômetro UV-Visível (Spectra Max 190). O conjunto de dados foi exportado para a planilha eletrônica em formato .csv utilizando o software SoftMax Pro 7 (SMP7) para posterior análise quimiométrica utilizando *scripts* em linguagem R. Os cromatogramas foram corrigidos em sua linha de base, relação sinal/ruído (*smoothing*) e normalizados. As regiões espectrais com sinais de absorbâncias típicas associadas às classes de metabólitos de interesse (e.g., fenólicos, carotenoides e clorofilas) foram identificadas e utilizadas para a identificação de *fingerprints* metabólicos associados aos tratamentos em estudo.

Em seguida, foi realizada a determinação do perfil de compostos carotenóidicos em cromatografia líquida de alta eficiência (UHPLC). Os extratos hidroalcoólicos (20 μ L, n = 3) foram então injetados em cromatógrafo líquido (Thermo Scientific, Dionex Ultimate 3000, UHPLC), equipado com detector de arranjo de diodos ($\lambda = 450, 475, 460$ e 440 nm), coluna de fase reversa C18 (Supelco Ascentis RP-Amide, 15cm x 4,6 mm \varnothing , 5 μ m, 35°C) e pré-coluna (C18 - Supelco Ascentis RP-Amide, 1,5cm x 4,6 mm \varnothing , 5 μ m). A eluição dos analitos ocorreu em modo isocrático, utilizando-se metanol: acetonitrila (90: 10, v/v) como fase móvel, em fluxo de 1 mL.min⁻¹ (adaptado de PILATTI et al., 2016).

A quantificação dos analitos baseou-se em curva-padrão de luteína (*Xanthophyll from Marigold*, pureza $\geq 75\%$, Sigma-Aldrich, USA) e considerou a área dos picos alvo para efeito dos cálculos de concentração dos metabólitos. O cálculo das integrais associadas às áreas dos sinais atribuídos aos compostos utilizou algoritmo disponibilizado no software Chromaleon 7 (v. 7.1.2.1478 - Thermo Scientific). Dada à expressiva discrepância de conteúdos de determinados metabólitos nas amostras, os picos majoritários e minoritários foram quantificados separadamente, a partir dos valores de áreas dos picos detectados na curva padrão de luteína, onde o sinal majoritário (Fração 1, Rt = 2,980 min - 97,7 \pm 1,1% do total da área dos picos) foi atribuído àquela xantofila, enquanto os dois picos minoritários adicionais, i.e., Rt = 3,280 min (Fração 2 - 1,6 \pm 0,2%) e Rt = 3,580 min (Fração 3 - 1,4 \pm 1,1%) foram considerados para cálculo das equações de retas usadas à quantificação dos analitos de menor concentração nas amostras. Em ambos os casos a relação entre as variáveis foi linear ($r^2 > 0,999$) nos intervalos de concentrações investigados. Os

conteúdos dos metabólitos nos extratos hidroalcoólicos (EH) das amostras biológicas foram expressos em ng/g de equivalentes de luteína para compostos majoritários e em ng/g de equivalentes de luteína esterificada para aqueles minoritários.

A identificação dos analitos nas amostras do endometaboloma de *U. lactuca* utilizou a cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada a detectores de arranjo de diodos e de massas, este último para confirmar a identidade dos metabólitos previamente observados com o detector espectrofotométrico. As análises cromatográficas adotaram as mesmas condições experimentais já descritas acima, enquanto a espectrometria de massas utilizou um espectrômetro de massa micrOTOF-Q II (Bruker Daltonics, Germany) acoplado ao cromatógrafo líquido (UFLC, Prominence – Shimadzu, Japan). Os espectros de massas dos metabólitos previamente identificados foram adquiridos em modo de varredura (m/z 200-1000), com fonte APPI (positivo) e os dados processados com auxílio do software Bruker Compass DataAnalysis (v. 4.2).

5.2.3 Análises estatísticas

A análise quimiométrica dos dados resultantes dos tratamentos utilizou *packages* em linguagem R (v. 3.3.3) rotineiramente empregados por nosso grupo de pesquisa, e.g., *specmine* (COSTA; MARASCHIN; ROCHA, 2016) e *ggplot2*, ambos disponíveis gratuitamente no repositório CRAN (The Comprehensive R Archive Network, <https://cran.r-project.org/>). Os *scripts* desenvolvidos para a análise de dados apresentam uma estrutura baseada em *datasets* que consideram arquivos diferenciados para conjuntos de dados e metadados, fazendo uso de funções específicas para conjuntos de dados tipicamente metabolômicos como perfis espectrais de varredura em UV-visível e de cromatogramas (HPLC, GC, por exemplo). Os *scripts* construídos para este documento foram adaptados de materiais suplementares pertencentes estudos já publicados (MORESCO et al., 2015a, 2015b).

Os dados coletados em UV-Vis foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido da comparação das médias pelo teste *post-hoc* de Tukey ($p \leq 0,05$). Também foram realizadas análises univariadas (teste *t*) quando considerando as concentrações (0 e 1 mg/L) ou o período de exposição ao estrógeno (0 e 48 h). O conjunto de dados processados foi submetido a análise estatística multivariada, aplicando métodos de Análise de Componentes Principais (PCA)

tanto para o espectro completo como separadamente para as janelas espectrais (*fingerprints*) de absorvâncias típicas de carotenoides (400 – 500 nm) ou de clorofilas (600 – 700 nm). Comparações entre as razões dos compostos com maiores absorvâncias também foram feitas a partir das médias por tratamento.

Para os resultados obtidos em análises em HPLC, após análises exploratórias, optou-se por analisar os resultados entre compostos majoritários, que apresentaram áreas de pico maiores que 2,50 mAU*min, e compostos minoritários, cuja áreas de pico foram menores que 0,60 mAU*min. A partir daí, como o realizado para análises dos dados de UV-visível, também foram realizadas ANOVA e testes de Tukey ou teste t, conforme o caso, além de PCAs e clusters. As razões entre os compostos também foram comparadas e consideradas como fatores nas análises. As concentrações de cada composto apontado foram calculadas a partir das áreas de cada pico e a equação da reta da curva padrão de xantofila de acordo com a classificação de concentração do composto (majoritário ou minoritário).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.3.1 Análise comparativa dos perfis espectrais de varredura UV-visível

As principais classes dos metabólitos secundários podem ser observadas em espectros de absorção de luz de extratos hidroalcolócos (EH) (MOCO et al., 2007). As análises dos extratos do endometaboloma de *U. lactuca* revelaram perfis espectroscópicos similares entre as amostras (Figura 12, lista dos parâmetros na Tabela 7), com maiores valores de absorvância entre 400-500 nm, região característica de compostos carotenóicos. Nesta, dois picos evidentes foram detectados, um com maior absorvância no comprimento de onda de 438 nm e outro em 467 nm. Quando comparados os perfis das amostras e do padrão analítico de interesse (Figura 13), percebe-se que os sinais de maior intensidade são próximos, mas não exatamente coincidentes. O deslocamento pode ser resultado do efeito da matriz biológica em estudo, que é uma matriz complexa equivalente ao extrato bruto, de forma que alguns componentes podem interagir, causando alterações em seus espectros de absorção (BOSCH OJEDA; SANCHEZ ROJAS; CANO PAVON, 1995). Para efeitos comparativos dos perfis espectroscópicos entre as maiores

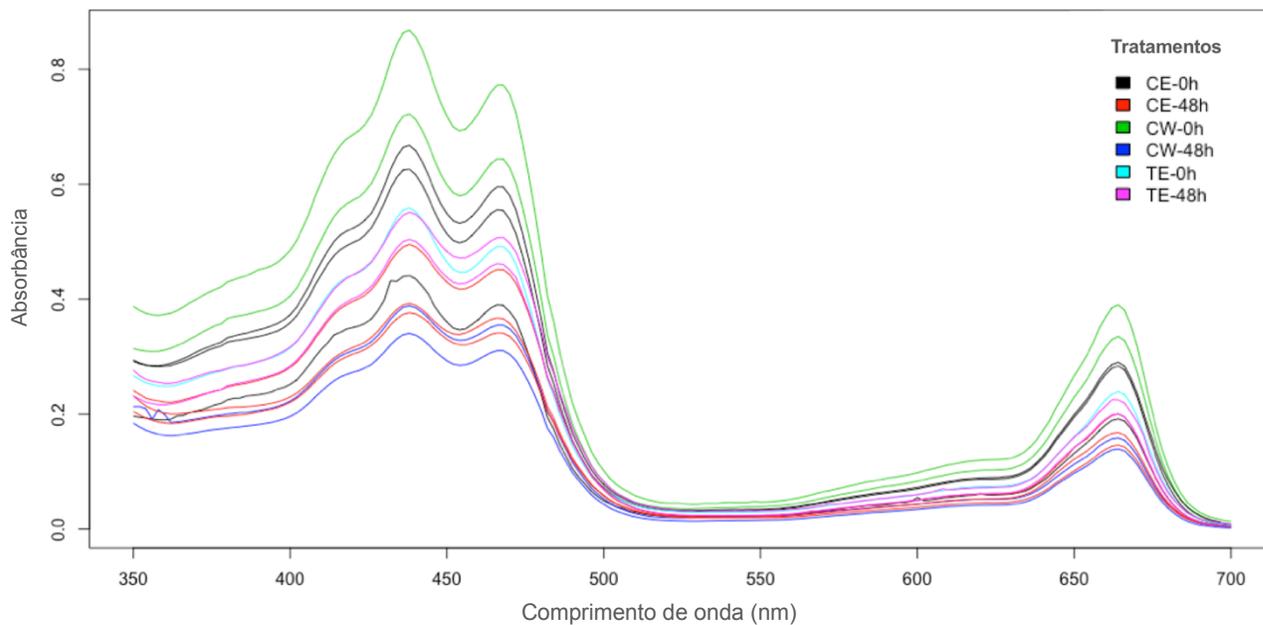
absorbâncias de carotenoides foram utilizados os valores detectados em 480 nm (CAR1) e 467 nm (CAR2).

Tabela 7: Códigos e parâmetros dos tratamentos utilizados nos experimentos *in vitro* de análise do efeito do EE2 sobre o endometaboloma de *Ulva lactuca*, sendo tempo de exposição, concentração do EE2 no meio de cultivo, e concentração do etanol adicionado ao meio de cultivo.

Tratamento	Código	Tempo (h)	EE2 (mg/L)	Etanol (%)
Controle em água	CW-0h	0 h	0 - Basal	0
Controle em água	CW-48h	48 h	0 - Basal	0
Controle com etanol	CE-0h	0 h	0 - Controle	0,05 %
Controle com etanol	CE-48h	48 h	0 - Controle	0,05 %
Tratamento com EE2 e etanol	TE-0h	0 h	1	0,05 %
Tratamento com EE2 e etanol	TE-48h	48 h	1	0,05 %

Fonte: Autor.

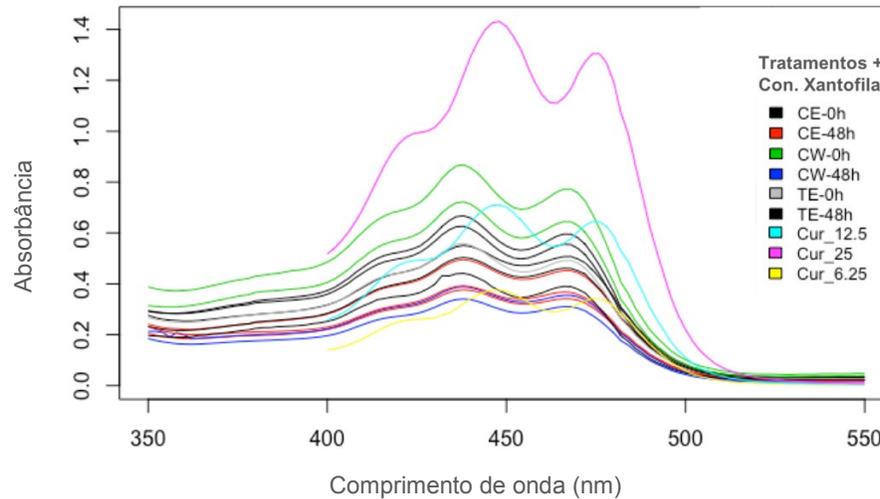
Figura 12: Perfis espectrais de varredura UV-visível (350-700 nm) dos extratos algais (etanol 70%, v/v) no experimento 1 (0 e 1mg EE2/L, 48h).



Fonte: Autor.

Tratamentos: Tabela 7.

Figura 13: Perfis espectrais de varredura UV-visível, com detalhe da janela espectral de 350 a 550 nm, dos extratos hidroalcoólicos de *U. lactuca*, consoante aos tratamentos com EE2, e do padrão de xantofila.



Fonte: Autor.

Para a curva de xantofila: Cur_25 = 25,0 $\mu\text{g/ml}$, Cur_12.5 = 12,5 $\mu\text{g/ml}$, Cur_6.25 = 6,25 $\mu\text{g/ml}$. Consultar Tabela 7 para referência dos tratamentos.

Outra região de destaque nos espectros é a janela espectral de 600 a 700 nm, onde são encontradas as maiores absorbâncias de clorofilas. Nesta região, as amostras apresentaram um pico evidente em 664 nm, que corresponde à absorbância máxima daqueles metabólitos em solução de etanol 95% (LICHTENTHALER; BUSCHMANN, 2001).

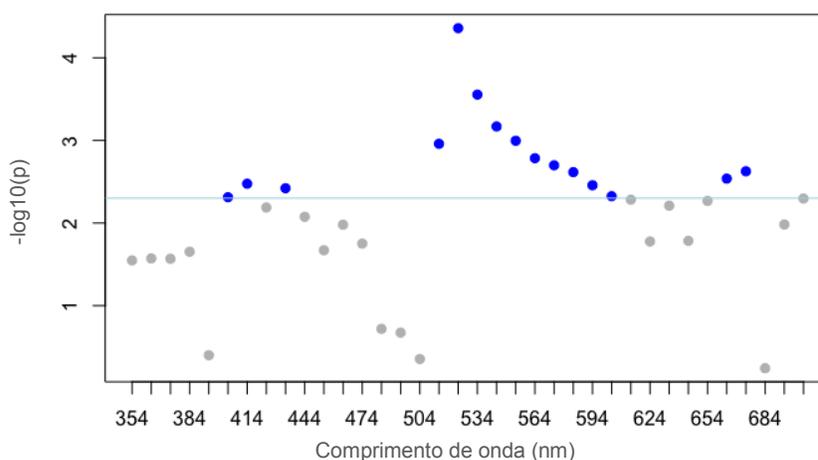
A análise multivariada dos dados de absorbâncias dos espectros UV-vis das amostras na janela de 350 a 750 nm revelou discrepâncias de perfis metabólitos observados no início (CW-0h, basal) e término (CW-48h) do experimento. O metabolismo basal (CW-0h) também se mostrou discrepante em relação ao controle (CE-48h) e ao tratamento com EE2 por 48h (TE-48h). Discrepâncias mais proeminentes nos perfis espectrais foram identificadas na faixa espectral de absorção das clorofilas. No entanto, o pré-processamento do espectro envolvendo a correção da linha de base permitiu detectar diferenças adicionais nos sinais em comprimentos de onda de 524, 534, 544 e 554 nm.

Considerando toda a série de perfis, o teste *t* foi realizado para averiguar se haviam diferenças entre diferentes concentrações de EE2 (0 e 1 mg/L), entre amostras com ou sem etanol no meio, e entre os diferentes tempos amostrais (0h e 48h). Destes, somente o tempo de exposição apresentou diferenças significativas ($p \leq 0,05$).

Para ressaltar as principais absorbâncias responsáveis pela discriminação das amostras ao longo dos momentos amostrais, a análise de *fold change* foi realizada, considerando um *threshold*

de 0,005 (Figura 14). Sinais de absorvâncias nas regiões características de carotenoides (400-500 nm) e de clorofilas (600-700 nm) foram identificados como relevantes à discriminação dos perfis metabólicos das amostras. No entanto, a maior concentração de absorvâncias importantes (círculos azuis) encontra-se justamente entre essas duas áreas.

Figura 14: Identificação de comprimentos de ondas relevantes à discriminação do endometaboloma de amostras de *Ulva lactuca* expostas ao EE2, detectados pela análise de *fold change*, a partir dos dados de absorvâncias (UV-Vis, 350 a 700 nm) de extratos hidroalcoólicos. Em azul: diferenças significativas (círculos azuis) da intensidade relativa (definida como uma mudança ≥ 2 vezes) dos sinais de absorvância relevantes à discriminação das amostras (*threshold* = 0,005)



Fonte: Autor.

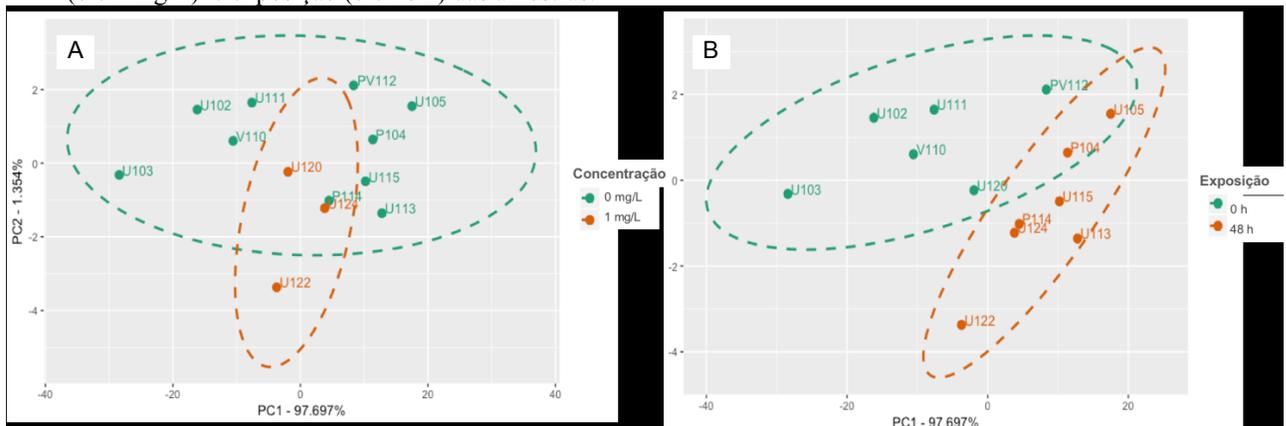
A análise dos componentes principais (Figura 15) dos dados de absorvâncias (350 a 700 nm) dos extratos hidroalcoólicos revelou uma clara discriminação das amostras consoante ao tempo de exposição (B) ao EE2, mas não em relação à concentração daquele xenobiótico (A). As componentes principais 1 (PC1) e 2 (PC2) capturaram ~99% da variabilidade das amostras nos modelos de classificação resultantes.

5.3.1.1 Fingerprints

Considerando os resultados das análises em *fold change*, modelos de classificação das amostras foram construídos a partir da análise de componentes principais, considerando-se os dados de absorvâncias das regiões de *fingerprint* de compostos carotenóidicos (400-500 nm), clorofilas (600-700 nm). Considerando apenas essas janelas espectrais para análise, as diferenças

significativas (teste t , $p \leq 0,05$) foram evidenciadas somente para a análise entre os diferentes tempos de exposição (0 e 48h), enquanto que a presença do EE2 no meio de cultivo não promoveu diferenças significativas que pudessem ser observadas em quaisquer das regiões espectrais contempladas.

Figura 15: Análise de componentes principais (PCA) dos dados de absorvâncias (UV-vis - 350 a 700 nm) dos extratos hidroalcoólicos de *Ulva lactuca*, após exposição *in vitro* ao EE2. Detalhes para concentração (0 e 1 mg/L) e exposição (0 e 48 h) das amostras.



Fonte: Autor.

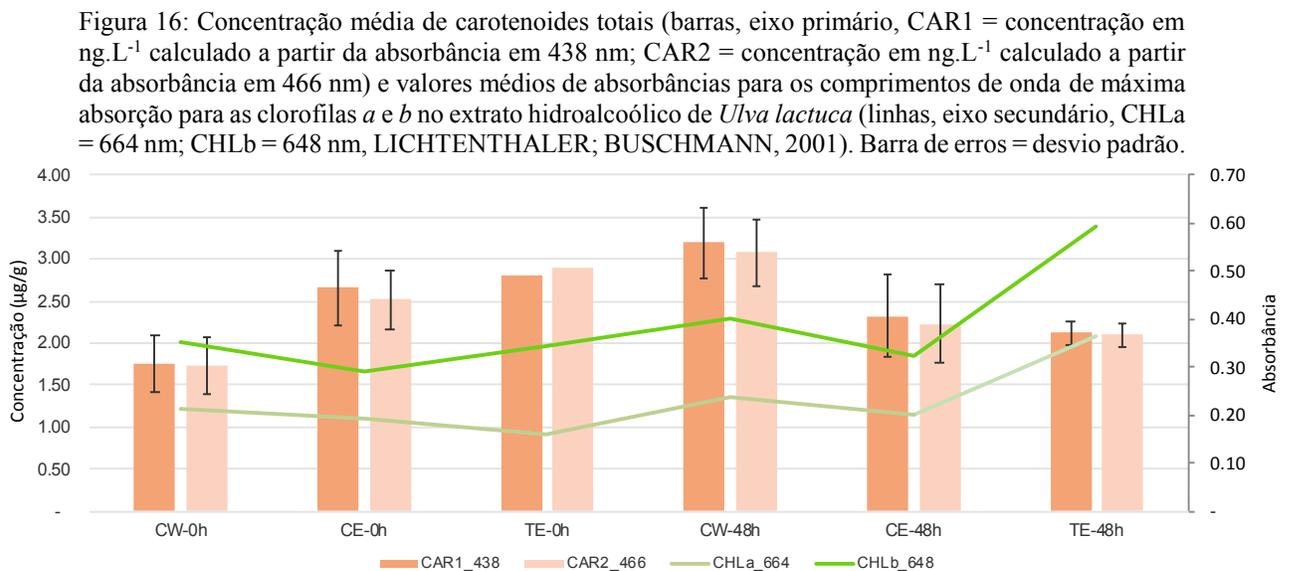
5.3.2 Carotenoides totais e absorvâncias máximas para clorofilas a e b

Os extratos hidroalcoólicos (EH) das amostras apresentaram teores superiores de carotenoides totais para o tratamento basal na 48^a h de cultivo (CW-48h, CAR1 = 3,191 ± 0,413 µg/g) em relação ao basal metabólico no tempo 0 h (CW-0h, CAR1 = 1,750 ± 0,337 µg/g). As médias das absorvâncias máximas para as clorofilas a e b foram maiores após exposição ao EE2 por 48 h (TE-48 h, 0,363 ± 0,039 µg/g e 0,230 ± 0,025 µg/g), comparativamente ao tratamento no tempo 0 h (TE-0h, 0,158 ± 0 µg/g) para clorofila a, e controle (CE-0h, 0,097 ± 0,008 µg/g). Considerando apenas as concentrações de carotenoides e as absorvâncias de clorofila para cada tempo amostral, observa-se que os controles com etanol apresentam valores de carotenoides totais mais próximos aos das amostras tratadas que em relação aos controles sem etanol (basal) (Figura 16). No entanto, a análise de variância (*One-way* ANOVA) de todo conjunto de dados espectroscópicos não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$) de conteúdos de carotenoides entre os tratamentos. As absorvâncias atribuídas às clorofilas, por outro lado, se mostraram discrepantes em função das concentrações de EE2 estudadas (ANOVA seguida do teste *post-hoc*

de Tukey ($p_{CHLa} = 0,007$; $p_{CHLb} = 0,002$). Na Figura 16, o aumento dessas absorvâncias nas amostras expostas ao hormônio após 48h pode ser observada. O teste de *post-hoc* de Tukey detectou diferenças significativas ($p = 0,008$) entre os valores médios de clorofila b, entre amostras coletadas após 48h de exposição ao xenobiótico (TE-48h) e o controle (CE-48h).

Em resposta à exposição a metais pesados, foi relatada a diminuição de biomassa e dos conteúdos de clorofila em *Ulva intestinalis* e *Sargassum angustifolium*, principalmente na presença de níquel e chumbo, sendo as respostas mais evidentes em *Sargassum angustifolium* (ALAHVERDI; SAVABIEASFAHANI, 2012). Além disto, observou-se que a clorofila a foi menos responsiva aos efeitos de exposição àqueles metais pesados.

Em revisão, Petsas e Vagi (2017) listaram diversos efeitos da exposição de poluentes orgânicos e inorgânicos sobre a atividade fotossintética de algas, principalmente em microalgas. Na maioria dos casos citados, tanto a atividade fotossintética como o conteúdo de clorofila foram afetados negativamente na presença das diversas classes de poluentes testados, sendo estes, parâmetros comumente monitorados em estudos de toxicidade. No entanto, o efeito de alguns contaminantes se destaca por determinar o aumento dos conteúdos destes pigmentos em resposta à exposição de poluentes, tais como TBT (microalgas marinhas) e Diuron em ensaios crônicos (perifiton natural, 29 e 32 dias) e o cobre em *Ulva*.



Fonte: Autor.

A presença do etanol no meio de cultura não resultou em diferenças significativas nas concentrações de carotenoides quando comparados todas as amostras por análise de variância. Todavia, quando comparadas somente amostras controle e basal utilizando o teste *t* de Student, as concentrações de carotenoides foram diferentes entre si, bem como os valores de absorbâncias de clorofila.

Outros bioensaios com *Ulva rotundata* (FRANKLIN, 1994; FRANKLIN et al., 1992) também usaram etanol como solvente de escolha para solubilizar o xenobiótico testado. No entanto, Stratton e Smith (1988) chamam a atenção para efeitos inibitórios do metabolismo resultantes do emprego de solventes em bioensaios, bem como à interação do solvente em relação ao composto tóxico solubilizado. No referido estudo, os autores encontraram interações antagônicas de 30% para o crescimento de *Chlorella pyrenoidosa* em concentrações finais de etanol acima de 0,5% (v/v), como solvente de atrazina. De interesse, ressalta-se que o etanol, de forma isolada, foi considerado um dos organosolventes mais tóxicos (DMF > etanol > DMSO > hexano > acetona > metanol) à microalga verde *C. pyrenoidosa*, com EC50 = 1,18% (v/v) (STRATTON; SMITH, 1988). El Jay (1996) também constatou a inibição do crescimento das microalgas *C. vulgaris* e *Selenastrum capricornutum* em 4 dias de cultivo, a despeito do uso de etanol na concentração máxima recomendada pela agência americana de proteção ambiental (0,05% - v/v, em testes agudos).

Os resultados aqui encontrados, demonstram claramente que a adição de etanol ao meio de cultura promove alteração no aparato fotossintético de *U. lactuca* já nos primeiros minutos após a exposição ao xenobiótico. Todavia, ao longo do tempo, a espécie parece se adaptar àquela nova condição, corrigindo os danos do processo, eventualmente através da ativação de vias metabólicas alternativas à detoxificação do organosolvente. É sabido que danos a membranas celulares podem resultar da exposição ao etanol e ainda que estes não sejam suficientes para provocar alterações significativas no organismo, podem torná-lo mais sensível ao efeito de um segundo xenobiótico, em função do aumento da permeabilidade das membranas e da subsequente internalização facilitada do xenobiótico (STRATTON, 1985). Outra hipótese de mecanismo de ação do etanol considera a disrupção da estrutura de membranas da célula e também de sistemas de transporte que, neste caso, diminuiriam a entrada do segundo agente tóxico (STRATTON, 1985), todavia, no caso deste estudo em questão, a primeira hipótese parece a mais viável.

Curiosamente, quando comparados os tratamentos controle, percebe-se que os teores de clorofila são menores quando da presença de etanol no meio de cultura, em ambos os tempos amostrais. De fato, este resultado sugere a toxidez daquele organosolvente ao sistema fotossintético de *Ulva lactuca*. Adicionalmente, na presença do EE2, os conteúdos daqueles pigmentos se mostraram similares ou ainda maiores ao observado no controle sem álcool etílico. Em revisão, Adeel e colaboradores (2017) apresentam evidências de que plantas como milho, grão de bico, feijão e trigo podem se beneficiar da presença de estrógenos que reduzem os sintomas associados ao dano oxidativo induzido por metais pesados. Em culturas da microalga *Dunaliella salina*, Belhaj e colaboradores (2017) observaram diminuição do dano ao DNA e das atividades de CAT (25%) e GPx 25 (0,42%), quando da exposição ao EE2 (1000 ng/L), bem como a indução da atividade de superóxido dismutase (SOD), em concordância com o reportado por Liu e colaboradores (2010).

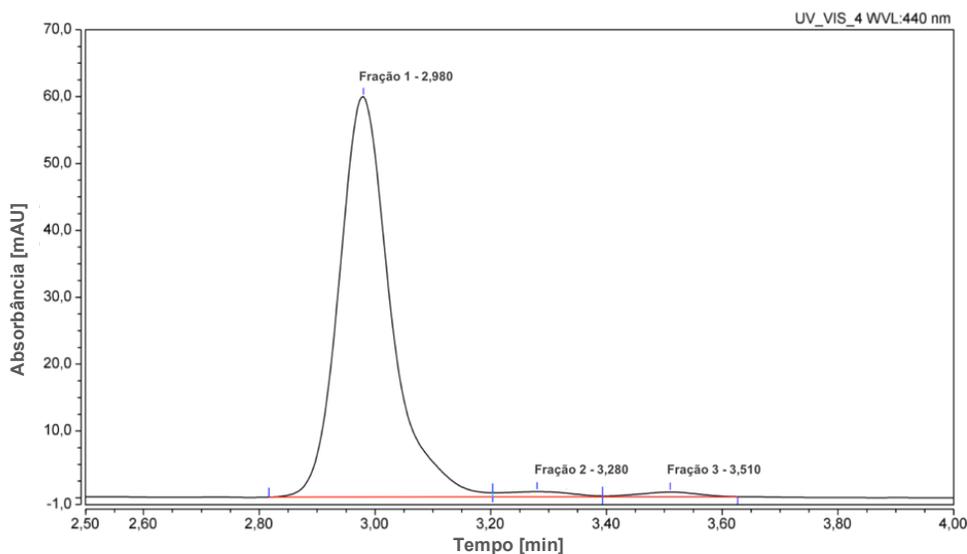
Tomados em conjunto, os resultados de conteúdos totais de carotenoides e de clorofilas a e b sugerem que estes últimos metabólitos são mais responsivos ao efeito da exposição ao etinilestradiol. Os carotenoides, por sua vez, parecem ser alterados, num primeiro momento, somente em função da adição do orgasolvente ao meio de cultura, i.e., etanol.

5.3.3 Identificação e quantificação de carotenoides por cromatografia líquida (HPLC) e espectrometria de massas (LC-MS)

Em todos os cromatogramas gerados via HPLC foram observados três analitos majoritários (SB1: 2,91 min, SB2: 4,63 min, e SB3: 6,48 min) e ao menos dez minoritários. O primeiro composto majoritário (SB1) foi coincidente em seu tempo de retenção com o composto majoritário do padrão de xantofila (Figura 17), o qual foi atribuído à all-trans-luteína (BREITHAUPT; WIRT; BAMEDI, 2002; LIN; LEE; CHANG, 2015). A curva padrão para aquela xantofila foi obtida algumas semanas após da análise dos extratos, eventualmente determinando a pequena alteração do tempo de retenção das amostras de extratos hidroalcoólicos (2.91 min) em relação ao padrão analítico (2.98 min). Como forma de checar a identidade do composto, alguns extratos foram analisados novamente quando da construção da curva-padrão de luteína. Como resultado, observou-se o match dos picos de interesse (3) em relação ao padrão de xantofila (

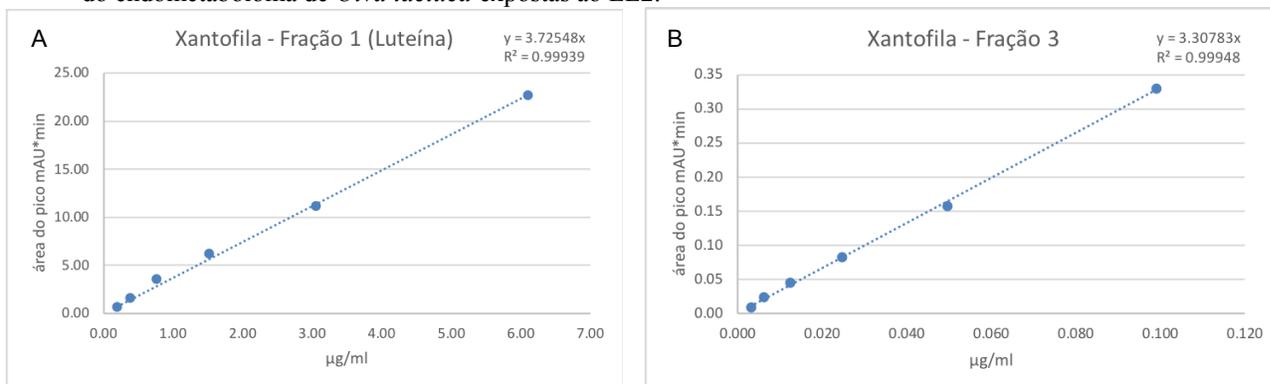
Figura 19).

Figura 17: Cromatograma (HPLC) do padrão de xantofila (concentração do exemplo = 1.56 $\mu\text{g/ml}$), apontando a luteína como composto majoritário (área Fração 1 = $6,19 \pm 0,03 \text{ mAU}\cdot\text{min}$, $97,7 \pm 1,1\%$) e dois outros picos minoritários (área Fração 2 = $0,10 \pm 0,01 \text{ mAU}\cdot\text{min}$, $1,6 \pm 0,2\%$; área Fração 3 = $0,08 \pm 0,00 \text{ mAU}\cdot\text{min}$, $1,4 \pm 1,1\%$).



Fonte: Autor.

Figura 18: Curvas-padrão de luteína (A - 0,20 a 6,10 ng/g) e dos compostos minoritários (B - luteína esterificada - 0,003 a 0,099 ng/g) utilizadas ao cálculo da concentração daqueles metabólitos em amostras do endometaboloma de *Ulva lactuca* expostas ao EE2.



Fonte: Autor.

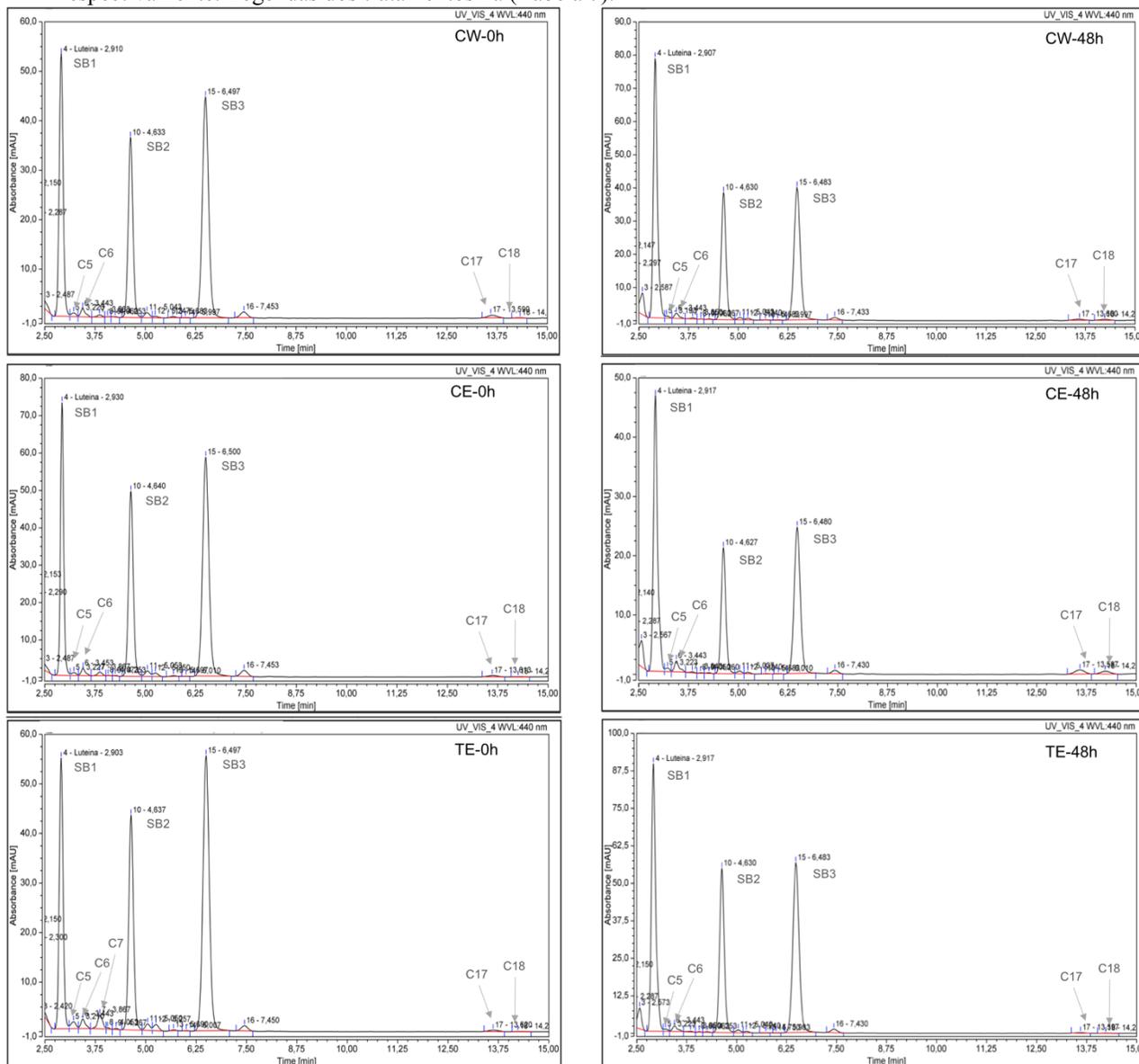
A espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida de alta eficiência (LC-MS) de fato identificou o íon com m/z 551 referente à luteína livre durante a injeção direta do padrão de xantofila no espectrômetro de massas (Figura 20). No entanto não foi observada a massa típica da luteína livre e talvez, tanto no padrão de xantofila, como nas amostras biológicas, este composto pode estar ocorrendo em uma ou mais formas esterificadas, conforme relatado para flores de

calêndula (*marigold*) (ABDEL-AAL; RABALSKI, 2015; BREITHAUPT; WIRT; BAMEDI, 2002; LIN; LEE; CHANG, 2015) cujo extrato foi usado como padrão neste estudo. Algumas massas de fragmentos de compostos prováveis foram identificadas em tempos de retenção distintos, tais como os íons em m/z 989.81 (3,2 min), m/z 569.55 (5,8 min), m/z 807.65 (5,8 min), m/z 817.72 (6,7 min), e m/z 548.68 (6,7 min), que podem ser atribuídos a diferentes ésteres de luteína e/ou de zeaxantina (RIVERA; CANELA-GARAYOA, 2011; WELLER; BREITHAUPT, 2003). A separação destes isômeros por cromatografia é considerada difícil e necessita certo conhecimento prévio dos compostos, uma vez que alguns isômeros *cis* de luteína não se encontrarão co-eluídos à zeaxantina (YOUNG, 1993). Neste trabalho apenas a substância SB1 foi identificada como luteína, SB2 e SB3 são carotenoides que permanecem sem identificação.

Xantofilas são derivados oxigenados de carotenos que compõem a classe dos carotenoides. Dentre as xantofilas de ocorrência frequente em espécies vegetais de importância alimentar destacam-se a β -criptoxantina, luteína e zeaxantina; hidroxicarotenóides de alto valor nutricional (BUNEA; SOCACIU; PINTEA, 2014). As três xantofilas acima listadas são reportadas em sua ocorrência no metaboloma de *Ulva lactuca*, juntamente com a violaxantina e anteraxantina (ABD EL-BAKY; EL BAZ; BAROTY, 2008; BISCHOF et al., 2002; PILATTI et al., 2016). Neoxantina, um outro oxicarotenoide, não foi reportada em *U. lactuca*, apesar de ter sido detectada em estudos com as espécies *U. pertusa*, *U. rotundata*, por exemplo (BHANDARI et al., 2012; FRANKLIN, 1994; FRANKLIN et al., 1992; KAKINUMA; KUNO; AMANO, 2004).

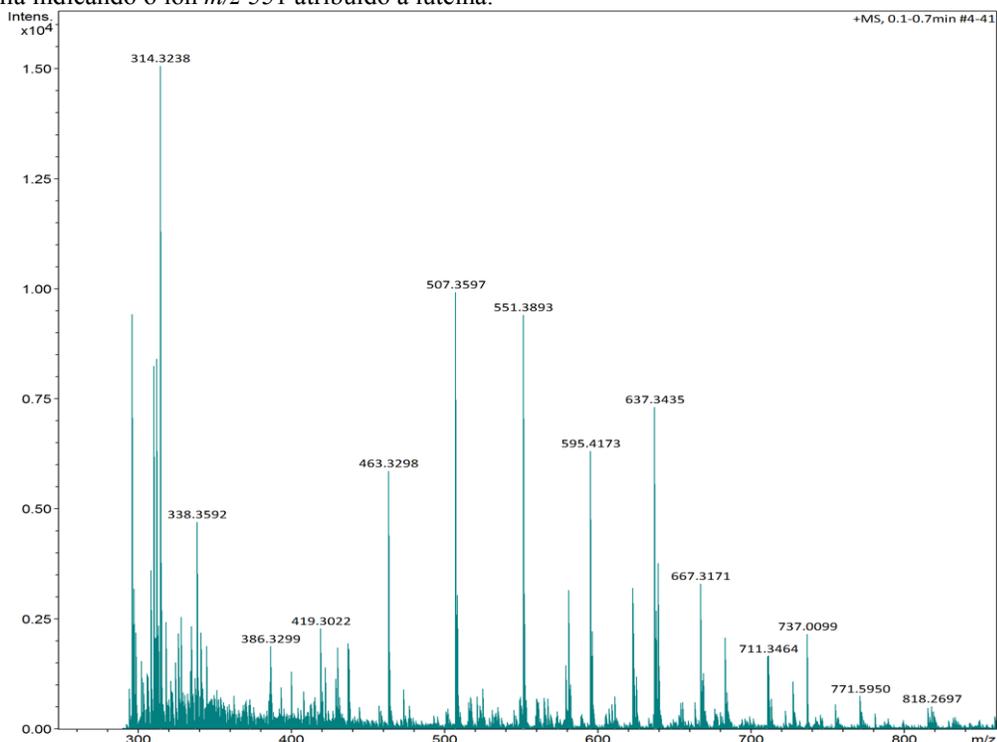
Ao realizar as análises no sistema LC-MS, esperava-se encontrar de forma clara, as massas correspondentes a luteína e a seus regioisômeros esterificados, como relatado por Mellado-Ortega e Hornero-Méndez (2012) e por Abdel-Aal e Rabalski (2015). Aqueles autores atribuíram aos íons de fragmentos principais com m/z 551 e m/z 533 às identidades de luteína livre e de suas formas monoéster ou diéster, respectivamente. Novas análises utilizando o sistema LC-MS deverão ser realizadas para aprimorar o método já utilizado para as matrizes complexas em questão, otimizando a ionização daqueles analitos, de modo a permitir uma melhor comprovação das identidades.

Figura 19: Cromatogramas de extratos hidroalcoólicos de amostras de *Ulva lactuca* expostas ao estrogênio sintético 17α -etinilestradiol (1 mg/L). Os cromatogramas das colunas da esquerda e da direita são representativos de perfis metabólicos de amostras coletadas às 0h e 48h de exposição ao xenobiótico, respectivamente. Legendas dos tratamentos na (Tabela 7).



Fonte: Autor.

Figura 20: Espectro de massas (injeção direta, fonte APPI, modo positivo, 200-1000 m/z) do padrão de xantofila indicando o íon m/z 551 atribuído à luteína.



Fonte: Técnico CEBIME/UFSC (acompanhado pelo autor).

5.3.4 Comparação entre as concentrações dos compostos carotenoidicos apontados nas análises via UHPLC

Em função da diferença de magnitudes entre as concentrações encontradas para compostos majoritários e minoritários apontados nas análises em cromatografia líquida, as análises quimiométricas foram realizadas separadamente para estes compostos.

5.3.4.1 Compostos majoritários

Apesar das concentrações dos analitos majoritários terem sido estimadas em ng/g de equivalentes de luteína, este não foi o carotenoide com maior concentração para todas as amostras de extratos hidroalcoólicos. Na

Figura 21, pode-se observar que a proporção entre os compostos, principalmente os majoritários, é função do tempo de exposição ao xenobiótico, por exemplo. Essa tendência torna-se evidente considerando a razão das concentrações médias dos compostos majoritários por tratamento. A Tabela apresenta os resultados de conteúdo dos metabólitos de forma relativa. O percentual relativo (PR) expressa em quantas vezes a média da concentração (UHPLC) de uma das substâncias majoritária foi maior ou menor (valores negativos) que outra. Observa-se que a luteína (SB1) é o composto majoritário somente nos extratos hidroalcoólicos oriundos de amostras coletadas após 48h de exposição ao EE2. Por sua vez, o analito SB3 apresentou as maiores concentrações médias no início do experimento (0h), enquanto SB2 foi o metabólito minoritário em todos os tratamentos investigados.

Uma vez que a síntese de metabólitos secundários é apontada como uma variável dependente de diversos fatores ambientais e de desenvolvimento (ABD EL-BAKY; EL BAZ; BAROTY, 2008; YOUNG, 1993), as diferenças entre as proporções dos compostos observados, principalmente entre SB1 e SB3 (Tabela 8) podem estar relacionadas à depleção do nitrogênio no meio de cultura, conforme apontado por Young (1993) para microalgas.

Tabela 8: Percentual relativo (PR) entre os compostos majoritários observados por UHPLC.

Tratamento	LUT>SB2*	LUT>SB3**	SB3>SB2***
CW-0h	20%	-21%	52%
CW-48h	77%	22%	45%
CE-0h	5%	-34%	59%
CE-48h	71%	16%	47%
TE-0h	23%	-14%	43%
TE-48h	67%	18%	41%

$$* PR = \left[\left(\frac{SB1}{SB2} \right) - 1 \right] \times 100$$

$$** PR = \left[\left(\frac{SB1}{SB3} \right) - 1 \right] \times 100$$

$$*** PR = \left[\left(\frac{SB3}{SB2} \right) - 1 \right] \times 100$$

Fonte: Autor.

A

Figura 21 revela a semelhança de padrões de conteúdos de SB2 e SB3, quando consideradas as variações das concentrações dos compostos majoritários em função dos tempos amostrais e dos tratamentos (concentrações) de EE2. Essa impressão é confirmada pela análise de correlação entre aqueles compostos, com valores de coeficientes de correlação (r) de 0,96 (Tabela 9). De forma geral, as amostras tratadas apresentaram conteúdos de metabólitos carotenóidicos algo inferior em relação às amostras controle e basal (tempo 0h). No momento amostral de 48h, esse padrão foi observado de forma inversa.

Tabela 9: Coeficientes de correlação (r) entre os teores de compostos majoritários em extratos hidroalcoólicos de amostras de *Ulva lactuca* expostas a EE2 *in vitro*.

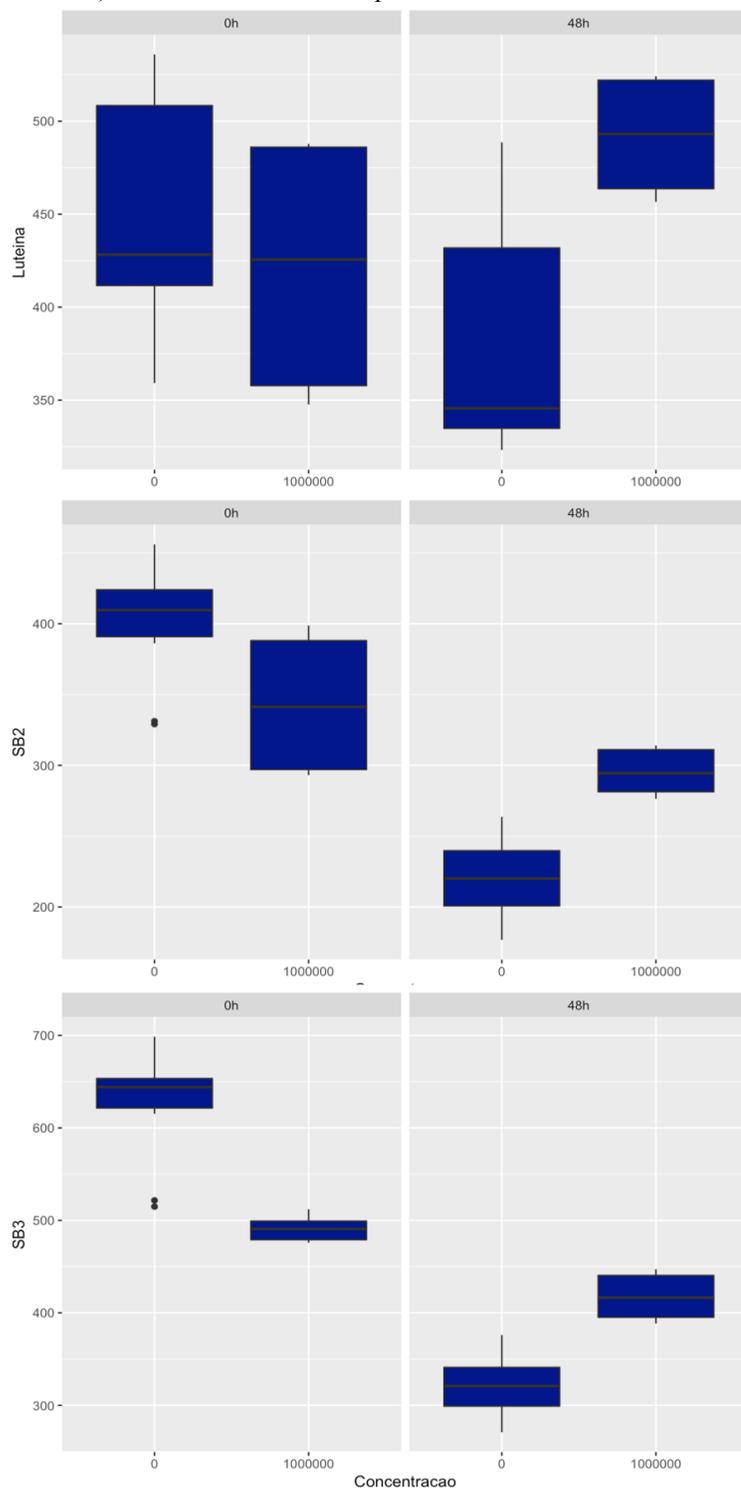
	Luteína	SB2	SB3
Luteína	1	0.5826656	0.4569855
SB2	0.5826656	1	0.9668119
SB3	0.4569855	0.9668119	1

Fonte: Autor.

A análise dos dados da concentração daqueles três metabólitos pelo teste *t-Student* revelou diferenças significativas entre as amostras coletadas nos tempos de exposição de 0h e 48h, independente da adição ou não de etanol ao meio de cultura, bem como para as concentrações de EE2 testadas (Tabela 10). Estes resultados são distintos em relação ao observado para os teores de carotenoides totais determinados por espectrofotometria UV-vis. De fato, esta técnica analítica permite determinar a concentração total de compostos de uma dada classe bioquímica, i.e., carotenoides no presente estudo, não considerando as diferenças entre as proporções destes nos extratos, como informado por técnicas cromatográficas (UHPLC), por exemplo.

A presença do etanol no meio de cultura, ainda que em baixa concentração (0,05%, v/v) parece afetar rapidamente o metabolismo da alga que apresenta diferenças significativas entre amostras do meio com ou sem etanol já no tempo 0h. Essa diferença deixa de ser significativa após 48h de exposição. Quanto à presença do hormônio, essas diferenças foram mantidas após 48h, para os compostos Luteína e SB2, sendo que a substância SB3, que não apresentava diferença no tempo 0h, passou a ser diferente após 48h.

Figura 21: Concentrações dos compostos (eixo y = ng/g) luteína e SB2 e SB3 nos extratos hidroalcoólicos de *Ulva lactuca* exposta ao EE2 (eixo x = ng/L;), nos tempos amostrais de 0h e 48h (quadros à esquerda e à direita, respectivamente). Barra de erros = desvio padrão.



Fonte: Autor.

Tabela 10: Valores de p resultantes do teste t de Student considerando os resultados em UHPLC a partir dos extratos hidroalcoólicos das amostras nos diferentes meios de cultura (com ou sem etanol 0,05%, v/v) e expostas a diferentes concentrações de EE2 (0 e 1 ml/L) nos momentos amostrais investigados (0 e 48h).

	Tempo de exposição 0h		Tempo de exposição 48h	
	Meios de cultura	Concentrações de EE2	Meios de cultura	Concentrações de EE2
Luteína	0.000147272	0.0000058	0.6369073	0.00000897
SB2	0.007645499	0.0083903	0.4229336	0.00001635
SB3	0.018950399	0.4303024	0.3910672	0.00046400

Fonte: Autor.

Aparentemente, a presença do hormônio sintético EE2 estimulou à produção dos três compostos majoritários. Se considerada a concentração média destes compostos determinada via HPLC (ng.g^{-1} , peso seco) nos tratamentos de exposição ao xenobiótico (

Figura 21, códigos na Tabela 7), observa-se que no tempo de 0 h a amostra tratada apresentou menores concentrações dos compostos em relação às amostras controle e basal, sendo este padrão revertido após 48 h de exposição. É fato que as proporções entre os compostos foram alteradas em função dos tratamentos, no entanto, para explorar quais as vias metabólicas estão sendo favorecidas ou inibidas, a identidade dos compostos importa.

5.3.4.2 Compostos minoritários

As amostras expostas ao EE2 não apresentaram diferenças significativas (Kruskal-Wallis) entre as amostras controle e basal, nos tempos 0h ou 48h, salvo para o composto C13 no tempo 0h. A exposição ao hormônio não parece influenciar as concentrações dos compostos minoritários, no entanto o tempo de cultivo sim para a maioria destes. Das amostras tratadas, apenas 3 compostos não diferiram entre os tempos amostrais: C17, C12 e C6.

5.4 CONCLUSÃO

Assim como o aumento da clorofila observado em UV-Visível para amostras tratadas após 48h de exposição, os resultados encontrados para os carotenoides majoritários via UHPLC reforçam o indício de que a exposição da alga *Ulva lactuca* ao estrógeno artificial 17 α -etinilestradiol promovem alterações significativas nos metabólitos secundários na espécie. A internalização do hormônio não foi confirmada pelas análises do endometaboloma.

Este é o primeiro trabalho que aponta alterações de qualquer natureza em macroalgas expostas ao EE2. Ainda que a concentração utilizada neste primeiro ensaio seja maior que as concentrações encontradas no ambiente, os resultados aqui discutidos chamam a atenção para os efeitos de um hormônio comumente encontrado em corpos hídricos adjacentes a regiões urbanas e trazem à tona informações até então desconhecidas e/ou ignoradas. A partir dos resultados iniciais da metabolômica de *U. lactuca* exposta a 17 α -etinilestradiol, o estudo das vias metabólicas dos compostos identificados será importante para o entendimento de como, e em que momento da síntese dos metabólitos, os xenobióticos estariam atuando e regulando (positiva ou negativamente) a produção de carotenoides e clorofilas por exemplo.

6 CAPÍTULO III – ESPECTROSCOPIA DE ¹H-NMR E FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA

O presente capítulo aborda a análise do efeito de 17 α -Etinilestradiol no endo- e exometaboloma da Chlorophyta *Ulva lactuca* a partir de técnicas espectroscópicas ¹H-NMR e ferramentas de bioinformática.

6.1 INTRODUÇÃO

A disponibilidade de informações sobre os efeitos de poluentes aquáticos, ou de outras alterações ambientais significativas, sobre o metabolismo de organismos aquáticos torna-se indispensável para prever o efeito de estressores antropogênicos nestes sistemas. A metabolômica ambiental com frequência avalia o efeito de xenobióticos em ecossistemas naturais fazendo uso de organismos "sentinelas" (ou representativos) de um ecossistema particular para revelar a condição do ambiente (GUPTA et al., 2013; VIANT, 2008). No entanto, considerar diferentes níveis tróficos para esta abordagem pode apresentar um cenário mais realístico e completo para o entendimento do cenário atual e para possíveis predições relacionadas aos efeitos de xenobióticos emergentes.

Amostras biológicas brutas são normalmente descritas como matrizes complexas de grande heterogeneidade metabólica que podem englobar compostos com pesos moleculares diversos, desde moléculas altamente polares a hidrofóbicas (KUHLSCH; POHNERT, 2015). Embora o estudo da ecologia química marinha tenha amadurecido nas últimas três décadas e gerado extensas listas de metabólitos compiladas para este ambiente (HAY, 1996), informações sobre a dinâmica metabólica e a sua composição ainda são um tanto vagas para alguns grupos de organismos como as macroalgas (GUPTA et al., 2013). A falta dessas informações limita bastante a comparação e a predição de possíveis respostas metabólicas de macroalgas mediante a exposição de novos xenobióticos, por exemplo.

Como abordado nos capítulos anteriores, a preocupação com a ocorrência do estrógeno 17 α -etinilestradiol (EE2) em sistemas aquáticos e seus efeitos nos organismos expostos aumentou muito nos últimos anos. Enquanto a grande maioria de estudos disponíveis sobre o efeito deste composto no ambiente marinho utilizam peixes e outros organismos da fauna marinha como

organismos alvo, este trabalho apresenta uma abordagem ainda pouco avaliada sobre os efeitos deste composto em organismos fotossintetizantes aquáticos, e traz pela primeira vez, a caracterização dos efeitos do EE2 sobre o metaboloma de uma macroalga marinha.

6.1.1 O uso de macroalgas como bioindicadores

As macroalgas são apontadas como biomonitoras eficientes para a medição de contaminantes em ambientes marinhos (CHAUDHURI et al., 2007; TORRES et al., 2008). A alga verde utilizada neste estudo, já foi apontada por diversos autores como um potencial biomonitor para a poluição por metais ao ser utilizada para determinar o conteúdo de metais bioacumulado em seus tecidos (CHAKRABORTY et al., 2014). Henriques e colaboradores (2017) confirmam a eficácia da espécie *Ulva lactuca* na remoção de metais de ambientes salinos em função da bioconcentração de Pb, Cd e Hg em tecidos algais bem acima daqueles encontrados na água do mar em que a alga se encontrava. A germinação de esporos e o crescimento de gametófitos de *U. pertusa* também foram propostos como monitores sensíveis não apenas para metais (Cu, Zn e Cd), mas também para outros poluentes como formalina e TBTO (Óxido de butil-butinato – um composto organo-estanho usado como biocida e conservante, HAN; CHOI, 2005).

Outros organismos fotossintéticos marinhos também têm sido utilizados em estudos toxicológicos de exposição a hidrocarbonetos (PILATTI et al., 2016; RAMLOV et al., 2013), a compostos desreguladores endócrinos (EDCs – BELHAJ et al., 2017; HOM-DIAZ et al., 2015; LAI; SCRIMSHAW; LESTER, 2002a; POCOCK; FALK, 2014; SHI et al., 2010), e a pesticidas (SCHWEIKERT; BURRITT, 2012), entre outros.

Chaudhuri e colaboradores (2007) sugeriram que macroalgas seriam melhores indicadores de metais pesados na fase dissolvida do que de compostos lipofílicos, pois estes não seriam prontamente utilizados devido ao baixo conteúdo lipídico das macroalgas. Não obstante, macroalgas também foram avaliadas como bons modelos biológicos para monitorar os efeitos tóxicos de moléculas hidrofóbicas. Por exemplo, alterações metabólicas relevantes foram detectadas em *Hypnea musciformis* exposta ao óleo diesel (RAMLOV et al., 2013) e em *U. lactuca* exposta à gasolina (PILATTI et al., 2016), e.g., espessamento de parede celular e alteração de assinaturas metabólicas (conteúdo de clorofila ou carotenoides). Em seu conjunto, aqueles resultados apontam as macroalgas marinhas como bons indicadores biológicos de eventuais

impactos de derivados de petróleo sobre o ambiente marinho. Schweikert e Burritt (2012) também observaram os impactos celulares resultantes da exposição da macroalga *U. pertusa* a níveis ambientalmente relevantes do inseticida Coumaphos, a despeito do xenobiótico ser considerado um agente com pouco ou nenhum impacto sobre algas por agências regulatórias. Os resultados do estudo demonstraram o aumento do estresse oxidativo e o aumento contínuo da atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo antioxidante após a exposição ao agroquímico.

Para compostos disruptores endócrinos (EDCs) ainda não foram relatados efeitos ou o acúmulo em macroalgas, no entanto outros organismos fotossintetizantes como microalgas foram apontadas como sendo sensíveis à presença destes compostos na água (BALINA et al., 2015; BELHAJ et al., 2017; POCOCK; FALK, 2014) e em alguns casos, capazes de removê-los do ambiente (MAES et al., 2014; SHI et al., 2010), ou mesmo bioacumulá-los (LAI; SCRIMSHAW; LESTER, 2002a; LIU et al., 2010; MAES et al., 2014).

A alga verde cosmopolita *U. lactuca* se destaca por tolerar amplas faixas de salinidade (2-35 ‰), temperatura, irradiância, concentrações de nutrientes (FOLMAR et al., 2000; MESSYASZ; RYBAK, 2011) e de alguns poluentes como descrito acima. Sua plasticidade ecológica e capacidade de responder rapidamente ao incremento de nitrogênio no meio permitem que eventualmente domine litorais impactados por atividades antropogênicas (ARÉVALO; PINEDO; BALLESTEROS, 2007; TEICHBERG et al., 2007), o que reforça a conveniência de seu uso como modelo de estudo para efeitos de toxicidade de xenobióticos, bioindicadores de qualidade ambiental e remediação de água.

6.1.2 Automação das análises de dados de ¹H-RMN

O uso de técnicas de ressonância magnética nuclear para identificar marcadores e diferenciar grupos bioquímicos em estudos da metabolômica e da bioquímica de organismos vivos tem aumentado significativamente (SIMMLER et al., 2014). Diversas vantagens podem ser listadas como motivo da recente emergência da espectroscopia ¹H-RMN para análise de matrizes complexas, dentre as quais pode-se ressaltar (i) a grande variedade de compostos que podem ser detectados (e.g., com carga ou neutro, hidrofóbico ou hidrofílico), (ii) a possibilidade de quantificação simultânea de metabólitos individuais em uma amostra sem a necessidade prévia de

separação cromatográfica ou derivatização, e (iii) a flexibilidade do método que permite a análise com diferentes tipos de amostras (e.g., solventes variados, tampões, sais ou outros excipientes – ELLINGER et al., 2013; SIMMLER et al., 2014). O método é ainda caracterizado por sua robustez, precisão e reprodutibilidade, podendo ser usado para análises quantitativas e determinação estrutural de compostos não conhecidos de forma precisa, mas é limitado em sua resolução espectral e sensibilidade para detecção de compostos em menor concentração, principalmente se comparado a métodos como a espectrometria de massas (MS – ELLINGER et al., 2013; EMWAS et al., 2018; SIMMLER et al., 2014).

Mesmo com os avanços observados para o emprego da técnica de RMN em amostras biológicas nas últimas décadas, a comparação entre perfis metabólicos em ^1H -RMN e a identificação de metabólitos em amostras complexas continua um desafio em função do grande número de informações presente em um único espectro e da frequente sobreposição de sinais (EMWAS et al., 2018). Apesar da aquisição dos espectros ser relativamente simples e rápida, o processamento manual e a análise dos espectros ainda dispense enorme tempo e carece de um pesquisador minimamente experiente. Frente a grande riqueza de informações contida nos espectros, o uso da bioinformática para apontar padrões entre grupos amostrais é altamente recomendável (EGHBALNIA et al., 2017). A automação da atribuição e quantificação de metabólitos, também aparece como uma ferramenta de grande importância que vem sendo abordada com mais frequência nos últimos anos e apresentando opções variadas de modelos e abordagens para o processamento dos dados (COSTA; MARASCHIN; ROCHA, 2016; HAO et al., 2012; JACOB; DEBORDE; MOING, 2013; ROBINETTE et al., 2008).

Deve-se levar em conta, no entanto, que a sensibilidade da análise em RMN depende muito do seu ambiente químico, onde diferenças sutis no pH, força iônica, temperatura e teor de proteína, entre outros, podem promover diferenças na posição dos sinais e na qualidade da linha de base (WELJIE et al., 2006) que podem inviabilizar a automação de determinadas análises. A proporção entre as concentrações dos diferentes compostos presentes em uma amostra também podem dificultar a resolução dos sinais dos analitos de menor concentração em função de outros sinais mais representativos, tais como os de analitos majoritários na amostra, ou mesmo prótons residuais do solvente utilizado (ABRAHAM et al., 2006; BHARTI; ROY, 2012).

Cada metabólito é diferencialmente sensível aos efeitos promovidos pelas diferenças no ambiente químico (WELJIE et al., 2006) e as ressonâncias resultantes da interação dos seus grupos

funcionais com o solvente escolhido também podem ser afetadas de maneira independente (ABRAHAM et al., 2006). O deslocamento de determinados grupos funcionais podem ser positivos ou negativos em relação a um dado solvente de referência dependendo do quão protegidos seus prótons estão e do número de ligações, por exemplo. Esse deslocamento não é linear, de forma que um mesmo metabólito pode apresentar deslocamentos positivos para certos grupos funcionais e negativos para outros, dificultando a predição desses deslocamentos e o uso global de diferentes solventes (ABRAHAM et al., 2006). O entendimento dos efeitos de todos esses fatores combinados à interação com os demais analitos de uma amostra complexa pode ser bastante complicado e dificulta a análise automatizada para o extrato bruto de amostras biológicas, por exemplo.

No capítulo 1 foi discutida a presença do estrógeno 17 α -Ethinilestradiol em águas brasileiras, enquanto que no capítulo 2 discutiu-se a exposição de organismos marinhos ao estrógeno e as alterações observadas no perfil metabólico da macroalga *Ulva lactuca* em UHPLC e cromatografia em UV-vis. Neste capítulo, *U. lactuca* foi igualmente exposta ao estrógeno EE2 e os efeitos desta exposição foram avaliados por meio de ressonância magnética nuclear (RMN) e ferramentas bioinformáticas que também foram utilizadas no capítulo 2, mas aqui serão exploradas no âmbito da aquisição e processamento dos dados em ^1H -RMN. Ainda neste capítulo encontram-se apontamentos sobre as dificuldades na automação da análise dessas informações e os possíveis desdobramentos desta abordagem.

6.2 METODOLOGIA

Neste capítulo estão apresentados 2 modelos experimentais, sendo que a parte quimiométrica em UHPLC e UV-vis do modelo experimental 1 foi apresentada no segundo capítulo deste documento.

6.2.1 Modelo experimental 1 (MExp_1: EE2, 1 mg/L, 48h)

Como mencionado acima, este modelo experimental segue o foi realizado no capítulo anterior utilizando espécimes de *Ulva lactuca* cultivadas in vitro (geração F1) por mais de 1 ano, sob condições de $23 \pm 3^\circ \text{C}$ e fotoperíodo de 12-12h. Essas mesmas condições foram mantidas

durante o experimento no qual as algas foram expostas a 1 mg/L de EE2 durante 48 h. Para cada 100 ml de meio de cultura (água do mar filtrada a 20 micra enriquecida com meio Provasoli a 25% e salinidade 35 ‰) foram colocados 5 discos de talos (8 mm Ø, $0,7 \pm 0,05$ mg de peso seco) mantidos em aeração constante por dois dias após o corte. Após esse período o meio de cultura foi trocado (25% Provasoli) e adicionado 1 mg de EE2 solubilizado em etanol 50 %, totalizando concentração de 0,05% de etanol p.a. (v/v) no meio de cultura. Foram separadas duas triplicatas de amostras controle, (i) uma com o mesmo volume de etanol adicionado às amostras tratadas (utilizado para solubilizar o EE2), e (ii) outra de amostra controle sem a adição de etanol (Tabela 11). As amostras foram retiradas no tempo 0h e no tempo 48h.

Com o objetivo de avaliar se a possível degradação do EE2 estaria ocorrendo a partir do metabolismo da alga, a análise do exometaboloma foi feita considerando o meio de cultura das amostras acima mencionadas e amostras extra do meio de cultivo tratado exatamente da mesma forma como realizado para o endometaboloma, mas sem a presença da alga.

6.2.2 Modelo experimental 2 (MExp_2: EE2, 100 – 10.000 ng/L, 144h)

Neste modelo, cada réplica experimental continha 6 discos de talos de *Ulva lactuca* (8 mm Ø, $0,79 \pm 0,10$ mg de peso seco), cultivados em 150 ml de água do mar filtrada (20 micra) e enriquecida com meio Provasoli (25%,) e salinidade igual a 35‰.

Como no MExp_1, o ensaio foi iniciado no segundo dia de após o corte dos discos, os quais foram mantidos nas mesmas condições em que já estavam aclimatados (fotoperíodo de 12h:12h, aeração ininterrupta e temperatura a 23 ± 3 °C). As algas foram expostas a diferentes concentrações de EE2 (98% pureza, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), ao longo de 144 h, sendo retirada uma triplicada (i.e., 24 discos) no tempo 0h e a cada 24h de exposição (Tabela 12). Como controle, foram consideradas triplicatas em meios de cultura sem adição de EE2, mas (i) com 0,05 % de etanol p.a. (v/v - concentração final do solvente adicionada à solução estoque nos tratamentos) e (ii) sem etanol.

Tabela 11: Código das amostras e parâmetros considerados no Modelo experimental 1 (MExp_1), no qual a macroalga *Ulva lactuca* foi exposta ao estrógeno 17 α -etinilestradiol.

EE2	Códigos (MExp_1)	Meio de cultura		Concentração (mg/L)	Tempo de exposição (h)	Metaboloma
Controle	L101-A	H2O	Com alga	0	0	Endo-; Exo-
Controle	L19-A	H2O	Com alga	0	48	Endo-; Exo-
Controle	L102-A; AcE 102	Com etanol	Com alga	0	0	Endo-; Exo-
Controle	L20-A; AcE 20	Com etanol	Com alga	0	48	Endo-; Exo-
Controle	AcE 134	H2O	H ₂ O	0	0	Exo-
Controle	AcE 137	H2O	H ₂ O	0	48	Exo-
Tratada	L103-B; AcE 103	Com etanol	Com alga	1	0	Endo-; Exo-
Tratada	L22-A; AcE 22	Com etanol	Com alga	1	48	Endo-; Exo-
Tratada	AcE 140	Com etanol	H ₂ O	1	0	Exo-
Tratada	AcE 143	Com etanol	H ₂ O	1	48	Exo-

Fonte: Autor.

Para avaliar se o incremento de massa estaria sendo de alguma forma alterado pela presença do EE2 ao longo do tempo, após serem lavadas em solução de formiato de amônio (0,5 M) e rinsadas com água destilada gelada, as amostras de alga foram liofilizadas e pesadas. A massa referente ao início do ensaio (0h) equivale à média do peso seco de 6 réplicas contendo 6 discos em cada (0,0079 g \pm 0,0010) e este valor foi utilizado como referência para o incremento de massa ao longo do tempo. Na comparação do peso seco, foi considerada a exposição ao EE2 a concentrações que variaram exponencialmente de 1 ng/L a 10.000 ng/L. Para a análise em RMN foram utilizadas somente as concentrações de 1.000 a 10.000 ng/L conforme a Tabela 12.

6.2.3 Amostragem e extração para análise do endometaboloma

Em cada momento amostral (Tabela 11 e Tabela 12) foram retiradas triplicatas de cada tratamento, seguido de rápida lavagem da biomassa em solução de formiato de amônio 0,5 M, à temperatura inferior a 4 °C. As amostras foram rinsadas com água destilada gelada, imersas em nitrogênio líquido, transferidas a freezer -80 °C, liofilizadas e armazenadas a -20 °C até o momento da extração.

A extração da biomassa algal para o endometaboloma segue o mesmo modelo já descrito no capítulo 2 (Item 5.2.1).

Tabela 12: Código das amostras e parâmetros considerados no Modelo experimental 2 (MExp_2), no qual a macroalga *Ulva lactuca* foi exposta ao estrógeno 17 α -etinilestradiol

EE2	Códigos (MExp_2)	Meio de cultura	Concentração (ng/L)	Tempo de exposição (h)	Metaboloma
Controle	L1B	H2O	0	0	Endo-
Controle	L2A	Com etanol	0	0	Endo-
Controle	L7B	H2O	0	24	Endo-
Controle	L9A	Com etanol	0	24	Endo-
Tratada	L6A	Com etanol	1.000	24	Endo-
Tratada	L7A	Com etanol	10.000	24	Endo-
Controle	---	Com etanol	0	48	Endo-
Controle	L15A	Com etanol	0	48	Endo-
Tratada	L11A	Com etanol	1.000	48	Endo-
Tratada	L13A	Com etanol	10.000	48	Endo-
Controle	---	Com etanol	0	96	Endo-
Controle	L24A	Com etanol	0	96	Endo-
Tratada	L17A	Com etanol	1.000	96	Endo-
Tratada	L21A	Com etanol	10.000	96	Endo-
Controle	L35A	Com etanol	0	144	Endo-
Controle	L36A	Com etanol	0	144	Endo-
Tratada	L31A	Com etanol	1.000	144	Endo-
Tratada	L33A	Com etanol	10.000	144	Endo-

Fonte: Autor.

6.2.4 Amostragem e extração para análise do exometaboloma

Para cada amostra do exometaboloma, 10 ml de meio de cultura de cada réplica foram combinados num total de 30 ml e então liofilizados. Uma alíquota de 1,5 g do sal resultante no processo de liofilização foram diluídos em 30 ml de solução de acetato de etila: água (1: 2, v/v), mantidos durante 10 min sob agitação constante e então sonicados (10 min.). A solução foi vertida

em funil de separação protegido da luz e incubada durante 1 h, à 4 °C. A fase aquosa foi descartada e o organossolvente foi removido em centrífuga acoplada a sistema de vácuo (Vacufuge Plus, Eppendorf), a temperatura ambiente, durante 20 min, seguido de liofilização e armazenamento do extrato seco a -20 °C até a análise por espectroscopia de ¹H RMN.

6.2.5 Aquisição de espectros ¹H RMN de amostras biológicas

As análises em ¹H-RMN foram realizadas no Laboratório Nacional de Biociências Brasileiras (LNBIO), do Centro Brasileiro de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), em Campinas - SP. Os extratos liofilizados do endo- e exometaboloma foram solubilizados em 600 µl (MExp_2 e MExp_3) ou 650 µl (MExp_1) de metanol-d4 (Merck), contendo 0,024% (m/v) de 3-trimetilsilil propionato de sódio-d4 (TSP-d4) como padrão interno. Os extratos foram agitados (vórtex), filtrados (0,22 µm) e transferidos para tubos de RMN (5 mm Ø) para análise subsequente. Os espectros de ¹H-RMN foram adquiridos em espectrômetro Agilent DD2, operando em frequência de 500 MHz de ¹H, a 25 °C (MARASCHIN et al., 2016). Antes da aquisição, o recurso *autoshim* (Z-gradient shim, 4 ou 8 non-spin shimming) foi aplicado a todas as amostras que apresentassem o parâmetro *50% linewidth* menor que 0,6. Para a análise do endometaboloma, somou-se um total de 256 *scans* (23 min. por aquisição), enquanto que para as amostras do exometaboloma, devido à menor concentração de compostos no meio, foram coletados 512 *scans* (46 min. por aquisição). Quando observadas grandes distorções da fase, o ajuste de fase foi realizado durante as aquisições. A supressão do sinal de metanol/água (singleto, 4,87 ppm) foi realizada apenas para as amostras do exometaboloma.

6.2.6 Aquisição de espectros ¹H RMN de compostos padrão em diferentes solventes

Espectros ¹H de padrões referentes ao metabolismo algal foram adquiridos utilizando diferentes solventes para observação das diferenças promovidas pelos solventes nos deslocamentos químicos de cada grupo funcional e identificação destes compostos nas amostras biológicas, afim de refinar o modelo de identificação dos metabólitos nas amostras construído em linguagem R a partir do *package specmine*.

Os espectros de ^1H -RMN foram registrados em espectrômetro de 500 MHz (Agilent DD2) no LNBIO/CNPEM e processados utilizando o software ACD/Spectrus Processor (v. 2018.2.5). Foram utilizados 10 mg de cada padrão para cada 600 μL de solvente deuterado puro (água-d2, DMSO-d6, metanol-d4, acetona-d6 e clorofórmio-d) contendo 3-trimetilsilil propionato de sódio-d4 (TSP-d4) ou 10 μL de tetrametilsilano (TMS) para referência dos deslocamentos químicos. Os padrões foram agitados (vórtex), filtrados (0,22 μm) e transferidos para tubos de RMN (5 mm \varnothing) devidamente limpos e nivelados antes de cada aquisição. Os espectros ^1H foram coletados com 64 ou 128 *scans*. Não foram utilizadas misturas de solventes e nem todos os padrões foram adquiridos nos 5 solventes em função da solubilidade completa desses.

Tabela 13: Solventes usados para aquisição de espectros dos padrões, sua fórmula linear e deslocamentos químicos da água em cada um dos solventes e sinal do solvente (entre parênteses a multiplicidade dos solventes. A água aparece sempre como um singlete).

Solvente	Fórmula linear	Sinal da água ^1H RMN (ppm)*	Sinal do solvente ^1H RMN (ppm)*	Índice de polaridade**
Água-d2	D ₂ O	4.79 (s)	4.79 (s)	/ 9.0
Dimetilsulfóxido-d6	(CD ₃) ₂ SO	3.33 (s)	2.54 (s)	7.2 / 6.5
Metanol-d4	CD ₃ OD	4.87 (s)	4.87 (s), 3.31 (5)	5.1 / 6.6
Acetona-d6	CD ₃ COCD ₃	2.84 (s)	2.09 (s)	5.1 / 5.4
Clorofórmio-d	CDCl ₃	1.56 (s)	7.26 (s)	/ 4.4

Fonte: Compilação de informações disponíveis nas publicações de (*) Gottlieb, Kotlyar e Ndelman (1997); (**) Gupta e colaboradores (1997); e (***) Snyder (1974)

6.2.7 Processamento dos espectros ^1H -RMN

O pré-processamento dos espectros ^1H -RMN foi realizada na estação de trabalho do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV) de forma diferenciada para os modelos experimentais.

6.2.7.1 Processamento MExp_1

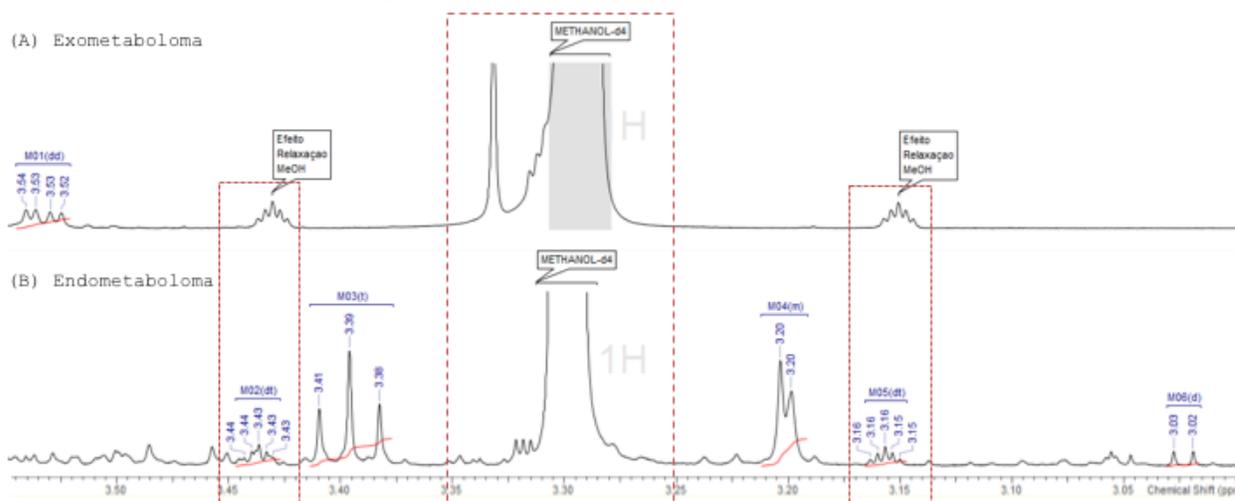
Essa etapa do processamento dos espectros ^1H -NMR consistiu na correção da linha de base, utilizando a plataforma Chenomx (v. 8.2) e para referenciar os deslocamentos químicos dos espectros em relação ao padrão interno (TSP-d4) e identificação das ressonâncias, utilizando o software ACD (v. 12.01). Os deslocamentos químicos foram expressos em δ (ppm) e referenciados

ao pico do TSP a δ (^1H) 0,00 ppm. A partir do conjunto de dados do espectro completo (0,20 - 13,00 ppm) foi gerada uma matriz de dados contendo os deslocamentos químicos de ^1H -RMN (ppm), considerando um valor de 0,0002 como unidade de intensidade normalizada mínima.

6.2.7.2 *Processamento MExp_2 e padrões de metabólidos*

Todo o pré-processamento foi realizado por meio do software ACD/Spectrus Processor (v. 2018.2.5). O ajuste de fase foi realizado automaticamente e a correção da linha de base foi executada manualmente para cada espectro. Os deslocamentos químicos foram expressos em δ (ppm) e referenciados ao pico do TSP a δ (^1H) 0,00 ppm. A identificação dos solventes e padrão interno também foram feita pelo próprio software e posteriormente conferida manualmente. Em todos os espectros, quaisquer sinais posicionados nas regiões entre 3,25 a 3,35 ppm e entre 4,6 a 5,2 ppm foram excluídos para evitar a interferência do sinal do solvente (metanol-d4) e da água (4,87 ppm) que apresentaram bases mais largas em alguns espectros. Também foram excluídos sinais típicos do efeito de relaxação que podem aparecer de forma espelhada e equidistantes, como ressonâncias-satélite ao lado de sinais mais expressivos como o do solvente ou de compostos majoritários (Figura 22). A seleção de picos com intensidade maiores que 0,0001 era realizada para todo o espectro, mas antes de exportar a tabela de picos, foi feita uma análise visual dos dados, com o objetivo de verificar as diferenças entre os espectros e eliminar marcações indevidas feitas automaticamente (e.g., ruído, efeito de relaxação, solventes e padrão interno).

Figura 22: Região do espectro ^1H -RMN de (A) exo- e (B) endometaboloma que destaca a região do solvente (metanol- d_4) não considerada na análise quimiométrica (3.25-3.35 ppm), bem como os sinais que coincidem com ressonâncias do efeito de relaxação normalmente observados próximo ao sinal do solvente ou a outros sinais de grande intensidade.

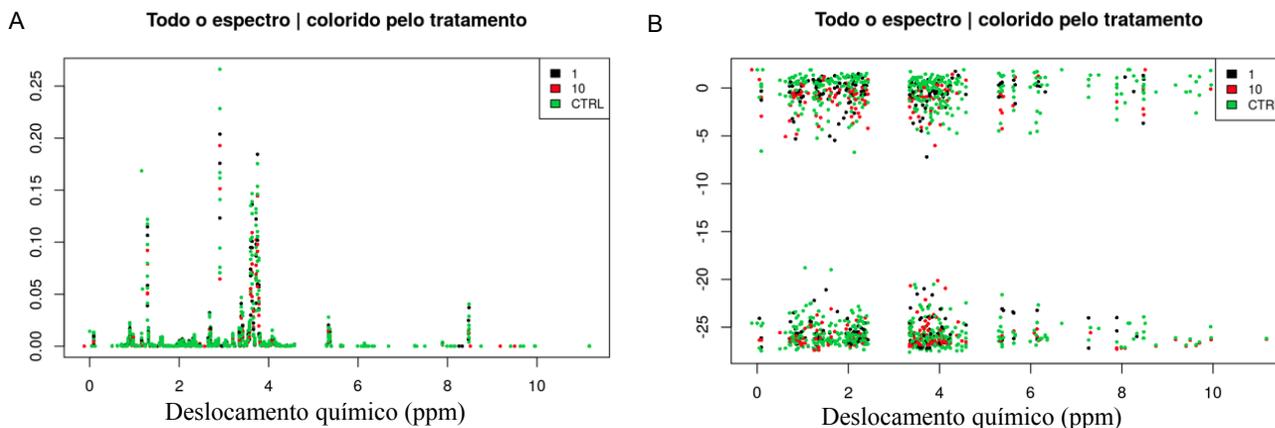


Fonte: Autor.

6.2.8 Processamento dos espectros ^1H -RMN e análises multivariadas

A partir das ressonâncias atribuídas a cada tratamento (*peak table*), foi realizada a transformação logarítmica dos dados e a transformação por *autoscaling* ao longo das amostras, que compara os metabólitos baseado em correlações por meio da divisão de cada variável (intensidades dos picos) por um determinado fator de *scaling* (Figura 23), de forma que todos os metabólitos tornam-se igualmente importantes nas análises (BERG et al., 2006). Os valores faltantes foram substituídos por zero e foram realizados cálculos de similaridade, com coeficiente combinatório simples, e análise de agrupamentos (*clustering*) com algoritmos de análise hierárquica (HC) ou *K-means*. Para comparação dos grupos foi usada foram usadas análises de variância (ANOVA) e o teste *t* de Student quando haviam apenas dois grupos.

Figura 23: Exemplo de um espectro completo (0,0-13,0 ppm) do endometaboloma (MExp_2) a partir das informações presentes nas tabelas de picos (A) antes e (B) depois do processamento (*autoscaling*). Cores representam as concentrações dos tratamentos (CTRL= 0 ng/L; 1 = 1.000 ng/L; e 10 = 10.000 ng/L).



Fonte: Sara Cardoso, Universidade do Minho (em colaboração).

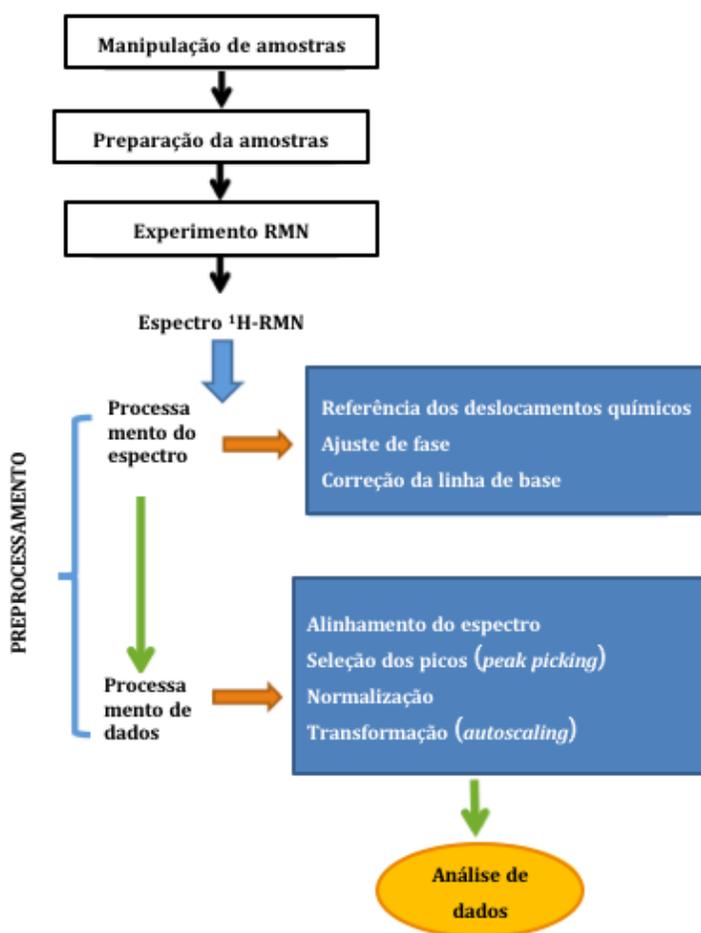
Os espectros de referência de EE2 e ribitol foram utilizados para identificar a presença destas substâncias nos espectros das amostras de algas utilizando código em linguagem R desenvolvido por Jacob, Deborde e Moing (2013). O alinhamento de picos espectrais agrupou os sinais de acordo com a sua posição, considerando-se uma janela de deslocamento de 0,01 ppm em comparação aos compostos de referência. Inicialmente, as análises foram feitas com as ressonâncias atribuídas às classes dos compostos químicos independentemente da janela espectral de referência, utilizando todo o espectro (0,20 – 13,00 ppm), e em seguida feita separadamente para as janelas espectrais referentes aos compostos alifáticos (0,20 – 3,00 ppm), anoméricos (3,00 – 5,50 ppm) e aromáticos (5,50 – 9,00 ppm).

O código atualizado do *specmine*, já permite que toda a etapa do pré-processamento do espectro e da análise dos dados (resumo das etapas na Figura 24) sejam feitas a partir do espectro ^1H -RMN ainda em formato FID. No entanto, neste trabalho, a primeira etapa do processamento de todos os espectros (referência, ajuste de fase e correção de linha de base) e parte do processamento de dados (alinhamento do espectro, seleção dos picos e normalização) foram feitas em softwares comerciais, tais como o Chenomx ou o ACD/Spectrum processor na estação de trabalho do LMBV. A transformação (*autoscaling*), bem como a identificação dos metabólitos e parte das análises multivariadas, foi realizada em colaboração com o grupo de pesquisa “Bioinformatics and Systems Biology Interdisciplinary Initiative” (BISBII) da Universidade do Minho em Braga (Portugal), junto à doutoranda Sara Cardoso, sob a orientação do professor Dr. Miguel Rocha.

6.2.9 Identificação de metabólitos

Para a identificação de metabólitos, também foi utilizado código em R desenvolvido para o *package specmine*, que separa os picos em clusters tendo em conta o seu comportamento ao longo das amostras (JACOB; DEBORDE; MOING, 2013) e depois avalia os matches entre todos os metabólitos de referência e cada um dos clusters.

Figura 24: Fluxograma do processamento espectral e etapas de pós-processamento na análise de dados ^1H -RMN.



Fonte: Autor, adaptado de Emwas e colaboradores (2018).

A versão do *package specmine* ainda não encontra-se disponibilizada no CRAN, tendo sido utilizada a versão em desenvolvimento que deverá trazer a opção dos ajustes aqui considerados

quando for disponibilizado. Na versão anterior deste código, utilizado na publicação da “Advances in Intelligent Systems and Computing” em 2018, foram usados os metabólitos de referência disponíveis através do código desenvolvido e obtidos no banco de dados da HMDB (*Human Metabolome Database* – WISHART et al., 2013), acrescidos apenas dos dois metabólitos de referência do EE2 e do adonitol adquiridos nas mesmas condições às das amostras (solvente, frequência, temperatura e pH). A versão atualizada do código considera um banco de metabólitos mais amplo e, até então, voltado à espécie *Ulva lactuca* aqui referenciado como AD_SPCMN (*Specmine AlgaeDatabase*) que além de considerar os metabólitos presentes na plataforma do HMDB, considera também espectros referentes a metabólitos algais importados de outras plataformas *open-access* como BMRB (*BioMagResBank* – ULRICH et al., 2008), MMCD (*Madison Metabolomics Consortium Database* – LEWIS et al., 2008) e SDBS (*Spectral Database System for Organic Compounds* – YAMAMOTO et al., 2007) adquiridos em diferentes solventes, e condições de ambiente químico (frequência, temperatura e pH), além de padrões de metabólitos algais adquiridos neste estudo como mencionado no item 6.2.6.

A tolerância do deslocamento químico para um emparelhamento ser considerado match foi de 0,01 ppm. O código utiliza diferentes scores para a classificação dos metabólitos identificados, a partir de informações presentes no banco de metabólitos. Detalhes sobre a versão atual do SPCMN e os parâmetros utilizados no código em R para a classificação dos prováveis metabólitos (*scores*) estão apresentados nos resultados.

A intensidade do pico foi considerada na análise multivariada, mas não na identificação dos metabólitos (item 6.2.9). Somente na segunda análise do exometaboloma (MExp_1), a intensidade dos picos foi considerada como a principal variável na análise multivariada.

6.2.10 Construção do banco de espectros ¹H-RMN de metabólitos algais

O bando de dados *Specmine AlgaeDatabase* (AD_SPCMN) engloba informações de diferentes estudos sobre algas, focando, neste primeiro momento, em metabólitos referidos para a macroalga *Ulva lactuca*. Alguns metabólitos de outras espécies de *Ulva* e outras macroalgas. A base de dados AD_SPCMN pode ser dividida em dois conjuntos principais de informação, o *Specmine's Database for Algae Metabolites* (AD_SPCMNM) e o *Specmine's Database for ¹H-*

NMR Spectra of Algae Metabolites (SPCMNS). O SPCMNS hospeda referências de publicações científicas usadas para criar o catálogo de metabólitos. É possível distinguir em quais algas ou grupo de algas (e.g., verdes, pardas, vermelhas) um metabólito foi identificado e referido. Ele também contém identificadores para cada metabólito como número CAS ou os identificadores disponíveis em bancos de dados externos reconhecidos, tais como Kegg, ChEBI, PubChem, HMDB e DrugBank, o que permite uma referência cruzada de informações entre esses bancos de dados. Mais de 200 referências de compostos encontrados em publicações científicas como típicos de algas, não tiveram um identificador externo correspondente para a conferência de duplicidade (e.g., se são sinônimos de metabólitos já cadastrados) ou importação de espectros a partir da referência cruzada com os repositórios de espectros de metabólitos. AD_SPCMNS contém ainda informações sobre a atividade ou o papel biológico do metabólito na alga, quando citado na referência onde o metabólito foi citado.

A primeira etapa para a elaboração do AD_SPCMNS foi o *text mining* em publicações científicas. A seleção de compostos da alga *Ulva lactuca* foi feita pela mineração automática e manual de termos isolados ou combinados em artigos científicos.

6.2.10.1 Compilação de metabólitos referenciados para algas

A mineração de texto automática foi realizada por meio da plataforma @note (desenvolvida pela SilicoLife, sediada em Braga, Portugal), por meio da recuperação e extração de informações em documentos científicos disponíveis em repositórios digitais, tais como PMC (*open-access*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>) e PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), sendo este último, considerado o maior catálogo bibliográfico biomédico disponível atualmente (LOURENÇO et al., 2009). Para a anotação dos metabólitos, metadados de recursos léxicos (e.g., dicionários e ontologia relevantes) foram carregados a partir do banco de dados do ChEBI (*Chemical Entities of Biological Interest* – <https://www.ebi.ac.uk/chebi/#>) ou do Kegg (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* – <https://www.genome.jp/kegg/>). As anotações de genes, proteínas, e vias metabólicas, entre outras classes biológicas, não foram consideradas, apenas as entidades “*organisms*” e “*compounds*”. Para reduzir a anotação excessiva de termos não desejados, foi criada uma lista de *stopwords* com termos ou combinação de termos que apareciam com frequência e que eram erroneamente anotados como metabólitos. O uso das *stopwords* impede

que uma entidade (e.g. um dado metabólito) que ocorra logo após uma determinada palavra, sigla ou sentença pré-estabelecida não seja anotada. O documento resultante, chamado de NER (*named entity recognition*), retorna informações da publicação (PMID, DOI, PUBMED ID), a entidade identificada (e.g., *leucine*, *betaine*, *glycine*), sua classe biológica (e.g., metabólito, proteína, gene, reação, organismo), a fonte do dicionário ou ontologia (e.g., Kegg ou ChEBI), o identificador do metabólito (o número identificador nos bancos de dados de referência, e.g., Kegg ou ChEBI) e a sentença extraída do documento investigado. Para exemplificar, no trecho abaixo de Pape e Luning (2006), foram identificados três organismos (tomates, gengibre e *Ulva lactuca*) e 3 metabólitos (melatonina, éter e acetona):

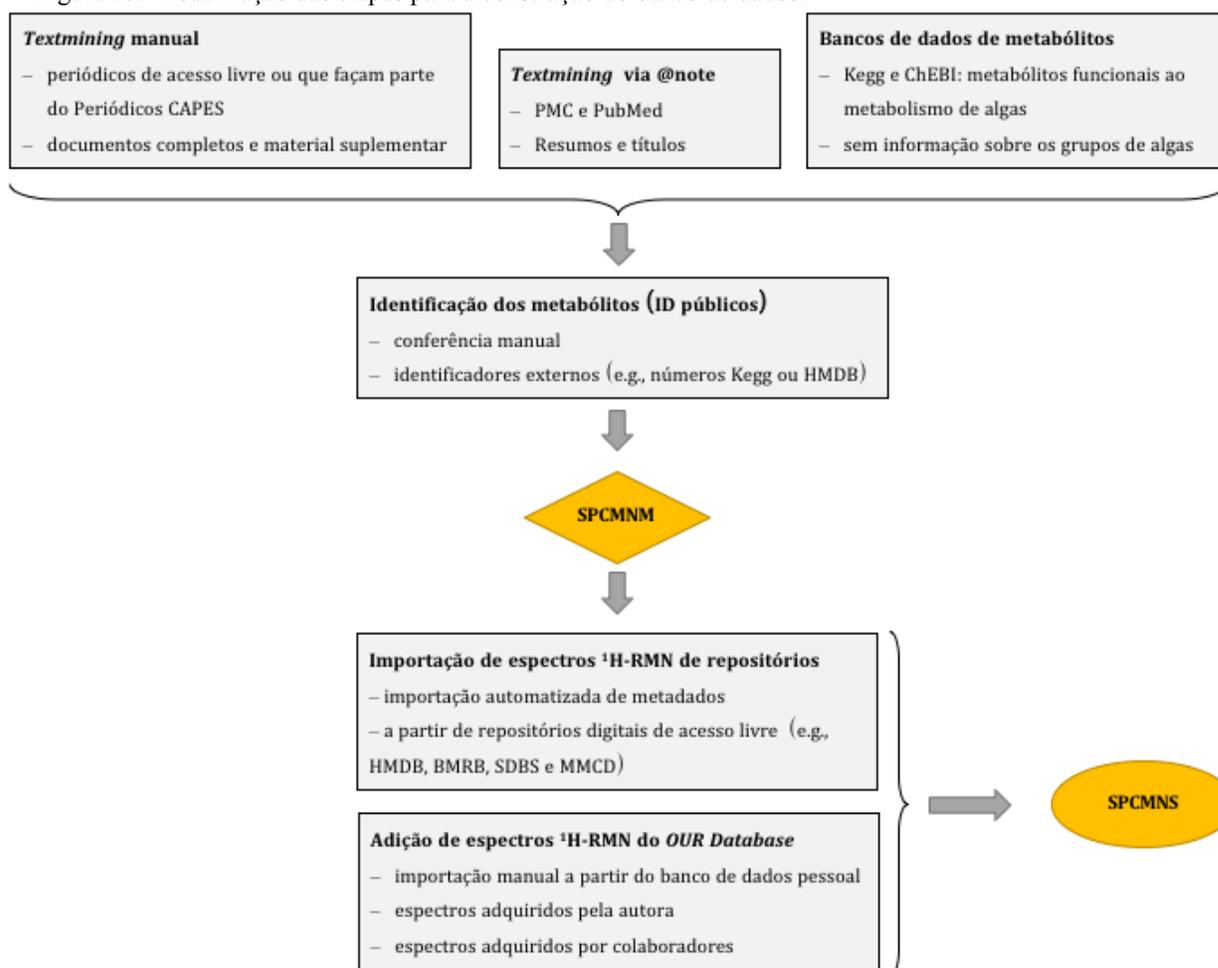
“In the present study, melatonin was quantified in tomatoes, ginger and the marine green macroalga, *Ulva lactuca*, after extraction with three different extraction methods based on ether, acetone or perchloric acid.”

Neste caso, sem o uso de *stopwords* não houve distinção entre solventes e metabólitos, e ainda que houvesse, a conferência manual *a posteriori* ainda é inevitável. Outro ponto a ser notado é que nomes populares de algumas entidades (e.g., tomate e gengibre) também foram reconhecidos em língua inglesa.

Já a mineração de texto manual foi feita a partir de documentos completos disponíveis no Portal Periódicos CAPES, uma biblioteca virtual brasileira que fornece produção científica internacional para instituições de pesquisa no Brasil (disponível em: <http://www.periodicos.capes.gov.br>). A busca foi feita diretamente pelo portal CAPES utilizando combinações de palavras-chave e a conferência documento a documento para a mineração de dados. Também foram utilizadas informações de materiais suplementares quando disponíveis. Outra fonte de informações utilizadas na busca manual foram bancos de dados de metabólitos online, tais como o ChEBI, Kegg e o SWMD (*Seaweed metabolite database* – DAVIS; VASANTHI, 2011) que trazem informações referenciadas dos metabólitos. No caso do SWMD, as referências bibliográficas relacionadas foram utilizadas na mineração manual quando disponíveis. No caso dos metabólitos listados no Kegg ou no ChEBI, era considerado classificação de papel biológico que constava nos repositórios como “*algal metabolite*” e como neste caso, a espécie da alga não era identificada, o metabólito que aparecesse exclusivamente por estas fontes, eram classificados como sendo de “outras macroalgas” ao invés de verdes, pardas ou vermelhas.

Apesar da busca por metabólitos ter sido toda voltada para a espécie *Ulva lactuca*, compostos identificados em outras espécies de *Ulva* e ou de outras macroalgas também foram anotados. Cabe salientar no entanto, que para as outras espécies, a lista de metabólitos encontra-se ainda bastante incompleta, uma vez que estes só foram compilados naqueles documentos que citavam também a nossa espécie alvo.

Figura 25: Visualização das etapas para a construção do banco de dados.



Fonte: Autor.

6.2.10.2 Identificação dos metabólitos

A etapa seguinte à mineração de dados foi referenciar todos os metabólitos anotados com identificadores de repositórios de acesso livre reconhecidos. Preferência foi dada aos identificadores dos bancos de dados HMDB e Kegg, e somente quando o metabólito não se

encontrava nesses repositórios, foram utilizados outros identificadores como os do ChEBI, PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), ChemSpider (<http://www.chemspider.com>), e Metabolomics Workbench (<https://www.metabolomicsworkbench.org>). Essa etapa foi realizada de forma exaustiva, buscando identificar o máximo de identificadores e, quando possível, qual dos isômeros havia sido citado no documento de referência para eliminar duplicatas considerando todos os sinônimos ou nome IUPAC citados. A cada composto compilado (sem duplicatas) foi dado um número AD_SPCMNM referente ao metabólito.

6.2.10.3 *Coleção automatizada de espectros ¹H-RMN*

A partir da correspondência dos identificadores atribuídos a cada metabólito, tornou-se possível a importação de espectros ¹H-RMN em repositórios digitais (e.g., HMDB, BMRB, MMCD e SDBS). Essa importação foi realizada de forma automática pelo grupo de pesquisa da Universidade do Minho, utilizando códigos em linguagem R. Conjuntamente aos espectros, foram anotados detalhes sobre a aquisição dos espectros sempre que disponível (frequência, pH, solvente e temperatura). Nem todos os metabólitos listados possuem o espectro ¹H-RMN disponibilizado de forma livre. Para alguns metabólitos, foram encontrados dois ou mais espectros em condições de aquisição diferentes, e todos foram coletados, recebendo códigos de identificação distintos.

Além das informações químicas e espectros de ¹H-RMN de bancos de dados externos, o AD_SPCMNS também engloba espectros do banco de dados privado do grupo de pesquisa de produtos naturais do LMBV (OUR Database), no qual constam espectros ¹H-RMN de padrões de metabólitos que foram sistematicamente adquiridos e armazenados por diversos colaboradores deste grupo de pesquisa.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 *Construção do Specmine AlgaeDatabase*

A identificação e a quantificação automática de metabólitos em espectros ¹H-RMN depende de uma biblioteca com informações espectrais destes compostos puros (LUDWIG et al.,

2012). Durante as análises para identificação de metabólitos, observou-se que ao considerar um modelo de identificação baseado exclusivamente em espectros de referência disponíveis no HMDB, a lista de metabólitos resultante era bastante abrangente (543 possíveis compostos para o endometaboloma do MExp_1). No entanto, compostos como a progesterona, testosterona ou androstenediona, que não são compostos esperados em algas, eram apontados como metabólitos bastante prováveis pelo modelo. Além disso, poucos metabólitos secundários característicos de algas haviam sido apontados ao utilizar apenas um banco de dados voltado ao metaboloma humano, como é o caso do HMDB.

A concepção de um novo banco de espectros ^1H -RMN de metabólitos algais surgiu a partir da necessidade em aprimorar o modelo que utiliza funções do *package specmine* para a identificação dos compostos. Após repetidas alterações no código utilizado à identificação desses compostos, percebeu-se que o código em si não encerrava a problemática, e que apesar de usar o HMDB, considerado uma das maiores bibliotecas públicas internacionais de metabólitos de RMN (LUDWIG et al., 2012), este ainda era insuficiente para a identificação em amostras algais. Lewis e colaboradores (também observaram a necessidade de uma biblioteca de metabólitos extensa que contemplasse dados experimentais de diversas espécies para a identificação de compostos em amostras ambientais. Os autores destacaram a abrangência insuficiente das bibliotecas disponíveis, sendo algumas particulares, ou coletadas de forma não padronizada e, assim, inacessíveis para a busca computadorizada. A singularidade estrutural ainda pouco explorada dos compostos naturais (HALABALAKI et al., 2014) e a especificidade de alguns desses compostos a um limitado grupo biológico, mantém os grandes repositórios (e.g., HMDB), que foram desenvolvidos para atender às demandas da metabolômica humana, alheios a esses compostos naturais com menor representatividade ou importância econômica. Este cenário evidencia a necessidade da organização dos dados espectrais orientada ao modelo biológico estudado.

A partir desses resultados preliminares pudemos perceber que a identificação automatizada de metabólitos a partir de informações espectrais ^1H -RMN é prejudicada se a base de dados consultada não contempla muitos metabólitos típicos das amostras ambientais, e embora a identificação por métodos bioinformáticos economize tempo, os resultados precisam ser verificados manualmente sobrepondo os espectros das amostras aos dos padrões puros identificados (LEWIS et al., 2008). O retorno excessivo de metabólitos improváveis ao utilizar bases de dados desenvolvidos para modelos biológicos muito distintos aos das amostras aumentam

muito o tempo de conferência manual a posteriori. Diversos modelos bioinformáticos para a identificação de metabólitos a partir de dados espectrais, utilizam os repositórios de espectros já referenciados neste documento. Os *packages* BATMAN (HAO et al., 2012) e BQuant (ZHENG et al., 2011), também foram desenvolvidos em linguagem R, e utilizam modelos bayesianos para a quantificação de compostos em espectros $^1\text{H-RMN}$ tendo o HMDB e/ou BMRB como principais fontes de informação espectral. O *MetaboHunter* (TULPAN et al., 2011) também aborda a identificação automática de metabólitos em misturas complexas e utiliza espectros $^1\text{H-RMN}$ das bibliotecas do HMDB e o MMCD como referência.

6.3.1.1 *Coleção de metabólitos – text mining automático vs manual*

Embora alguns dados possam ser recuperados diretamente dessas bibliotecas digitais públicas, a maior parte das informações ainda encontra-se na literatura e torna o *text mining* indispensável para esse tipo de coleção de metabólitos (LOURENÇO et al., 2009). Neste trabalho, foi observado que a mineração automática realizada a partir de resumos não trouxe um número de metabólitos muito maior que o alcançado analisando manualmente documentos inteiros. Em contrapartida, a adição de novos metabólitos, ainda pouco referenciados ou específicos para sistemas algais (e.g., alguns carotenoides, sesquiterpenos, ou fitoesteróis) foram mais facilmente encontrados utilizando o @note (e.g., FLODIN; WHITFIELD, 1999). Além disso, o método automático localizou documentos interessantes que ainda não haviam sido encontrados na busca manual e que puderam ser então analisados manualmente. É possível analisar textos completos utilizando a ferramenta automática de *text mining*, no entanto, o acesso a informações tabeladas, principalmente quando o trabalho consultado refere-se a diversas espécies, foi mais eficiente por meio da mineração manual.

6.3.1.2 *Specmine AlgaeDatabase (AD_SPCMN)*

Atualmente a coleção de metabólitos algais do *Specmine AlgaeDatabase* (AD_SPCMN) engloba 819 compostos devidamente referenciados com pelo menos um identificador (582 identificadores do HMDB e/ou Kegg, 167 do ChEBI, e 29 do ChemSpider e/ou PubChem). Ainda

há uma lista de cerca de 80 metabólitos para os quais não foram encontrados identificadores em outros bancos de dados públicos. Estes no entanto não foram considerados nas estatísticas apresentadas a seguir.

O número total de compostos compilados pode parecer pequeno se comparado aos mais de 20.000 metabólitos que haviam no MMCD ainda em 2008 (LEWIS et al., 2008), ou aos 41.806 metabólitos anotados no HMDB (JOHNSON; LANGE, 2015). No entanto, se considerado que, apesar de haverem metabólitos referentes a outras macroalgas (Tabela 14), a busca desses compostos foi toda voltada à coleção de dados espectrais referente aos metabólitos de uma única espécie, então este número torna-se um pouco mais expressivo. Essa informação extraída da literatura sobre a ocorrência dos metabólitos por classe das algas permite a definição de novos *scores* a serem adicionados ao algoritmo.

Tabela 14: Espécies algais que apresentam um ou mais metabólitos referenciados no *SPECMINE AlgaeDatabase*.

Algas vermelhas	Algas verdes	Algas pardas
<i>Chondria</i> spp.	<i>Ulva lactuca</i>	<i>Alaria esculenta</i>
<i>Chondrus crispus</i>	<i>Ulva arasakii</i>	<i>Ascophyllum nodosum</i>
<i>Furcellaria lumbricalis</i>	<i>Ulva conglobata</i>	<i>Chordaria flagelliformis</i>
<i>Gracilaria dura</i>	<i>Ulva fasciata</i>	<i>Fucus</i> spp.
<i>Gracilariopsis</i> spp.	<i>Ulva intestinalis</i>	<i>Halidrys siliquosa</i>
<i>Laurencia</i> spp.	<i>Ulva pertusa</i>	<i>Himanthalia elongata</i>
<i>Mastocarpus stellatus</i>	<i>Ulva rigida</i>	<i>Laminaria digitata</i>
<i>Palmaria palmata</i>	<i>Ulva</i> spp.	<i>Pelvetia canaliculata</i>
<i>Porphyra</i> spp.	<i>Cladophora rupestris</i>	<i>Saccharina latissima</i>
<i>Porphyra umbilicalis</i>	<i>Codium</i> spp.	<i>Sargassum tenerrimum</i>
Outras Rhophyta	Outras Chlorophyta	Outras Phaeophyceae
Macroalgas não especificadas		

Fonte: Autor.

Na Tabela 15 encontram-se os totais de metabólitos (SPCMNM) e de espectros (SPCMNS) que hoje compõem o AD_SPCMNS. O total de metabólitos neste caso (739), é menor que o número de metabólitos coletados, pois na tabela encontram-se somente aqueles compostos sobre os quais conseguimos importar o espectro correspondente em repositórios públicos. Para alguns dos metabólitos foram coletados dois ou mais espectros encontrados com variações do seu método de aquisição (solvente, pH, temperatura), de forma que o número total de espectros ultrapassa o número de metabólitos.

Não foram encontradas referências externas para todas as entidades anotadas e a grande maioria dos artigos não fornece identificadores para os metabólitos listados para a espécie alvo, ou apresenta a informação incompleta (e.g., nome popular que englobe mais de um composto ou seus isômeros) de forma limitante à correta identificação do analito. A falta de padronização quanto à nomenclatura também limita a exclusão de anotações que tenham sido anotadas em duplicata quando um mesmo composto é referido por nomes diferentes nas publicações consultadas, o que consequentemente, diminui as chances de localização e importação dos espectros ¹H-RMN correspondentes nas bibliotecas digitais.

Tabela 15: Número de metabólitos (SPCMNM) e espectros (SPCMNS) compilados a partir de bases de dados externos (BMRB, HMDB, MMCD e SDBS) e pessoal (OUR), por frequência (MHz).

FREQ. (MHz)	SPECMINE AlgaeDatabase		PESSOAL	REPOSITÓRIOS EXTERNOS			
	SPCMNM ¹	SPCMNS ²	OUR ³	BMRB	HMDB	MMCD	SDBS
400	263	192	0	65	116	1	81
500	309	213	48	108	153	0	0
600	166	151	1	52	113	0	0
700	1	1	0	1	0	0	0
Total	739	557	49	226	382	1	81

Fonte: Autor.

¹ SPCMN = *Specmine's Database for Algae Metabolites*; ²SPCMNS = *Specmine's Database for ¹H-NMR Spectra of Algae Metabolites*; ³OUR Database = Coleção de dados e metadados de espectros ¹H-RMN de compostos padrões referente aos organismos estudados pelo Grupo de Pesquisa de Produtos Naturais do LMBV; ⁴BMRB = BioMagResBank (ULRICH et al., 2008); ⁵HMDB = *Human metabolome database* (WISHART et al., 2013); ⁶MMCD = *Madison Metabolomics Consortium Database* (LEWIS et al., 2008); ⁷SDBS = *Spectral Database System for Organic Compounds* (YAMAMOTO et al., 2007).

As tabelas Tabela 15, Tabela 16 e Tabela 17 apresentam as características dos espectros ¹H-RMN que hoje compõem o Specmine *AlgaeDatabase*. Observando os dados na Tabela 15, podemos apontar os repositórios HMDB (51,7%) e BMRB (30,6%) como as principais fontes para importação dos espectros para a composição do AD_SPCMNS, enquanto 6,6% dos espectros (OUR Database) são provenientes dos arquivos pessoais da autora ou espectros de padrões cedidos por colaboradores do grupo de pesquisa de produtos naturais do LMBV. Na mesma tabela, observa-se ainda que espectros em metanol-d₄, utilizado para aquisição das amostras biológicas contempladas neste estudo, perfazem apenas 3,3% do total de espectros do AD_SPCMNS. Como a principal fonte de espectros é um repositório voltado ao metaboloma humano, a maioria dos estudos realizados e adotados como base de dados utilizaram água deuterada como principal

solvente para aquisição dos espectros ¹H-RMN. Assim, água-d2 é o principal solvente no banco, representando 76% dos espectros disponíveis, seguido de DMSO-d6 (10.8%), segundo solvente com maior representação, sendo o solvente de escolha para compostos farmacêuticos por sua excelente solubilidade para moléculas próticas e carregadas (insolúveis em clorofórmio), além de ser miscível em água, biodegradável e apresentar baixa toxicidade (ABRAHAM et al., 2006). O intervalo de pH de 7,0 a 7,4 equivalem a 95,4% dos espectros adquiridos em água-d2 (Tabela 17).

Tabela 16: Número atual de espectros da base de dados SPCMNS apresentada por solvente e por frequência (MHz) de aquisição.

FREQ. (MHz)	SOLVENTES									
	DMSO (1)	5%_DMSO (1)	Acetona (2)	C ₂ D ₂ Cl ₄ (3)	C ₆ D ₆ (4)	CD ₂ Cl ₂ (5)	CD ₃ CN (6)	CD ₃ OD (7)	CDCl ₃ (8)	D ₂ O (9)
400	64	0	1	1	1	1	2	2	25	166
500	10	0	4	0	0	0	0	15	28	252
600	5	1	0	0	0	0	0	7	8	145
700	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	80	1	5	1	1	1	2	24	61	563

Fonte: Autor.

¹ Dimetilsulfóxido-d6; ² Acetona-d6; ³ 1,1,2,2-Tetracloroetano-d2; ⁴ Benzeno-d6; ⁵ Diclorometano-d2; ⁶ Acetonitrila-d3; ⁷ Metanol-d4; ⁸ Clorofórmio-d; ⁹ Água-d2.

Tabela 17: Número atual de espectros da base de dados SPCMNS apresentada por intervalos de pH e por frequência (MHz) de aquisição.

FREQ. (MHz)	PH					
	1.00 - 6.99	7.00	7.01 - 7.03	7.40	9.00 - 12.00	NA
400	0	74	0	61	0	128
500	12	144	0	105	2	46
600	3	93	10	50	0	10
700	0	0	0	1	0	0
Total	15	311	10	217	2	184

Fonte: Autor.

O *Specmine AlgaeDatabase* (AD_SPCMNS) foi idealizado para ser dinâmico e permitir que novos metabólitos e espectros sejam acrescentados a qualquer momento. A adição de novos espectros por parte de outros colaboradores é incentivada e metabólitos referenciados para outros organismos alvo podem igualmente ser caracterizados em novos grupos biológicos, se estes ainda não estiverem contemplados (e.g., microalgas, banana, jabuticaba, orégano). A incorporação de novos metabólitos tende a acontecer naturalmente à medida que os demais colaboradores do grupo

de pesquisa de Produtos Naturais façam uso da ferramenta, bem como colaboradores de outros grupos de pesquisa que o requeiram. A pontuação dada a cada classe ou grupo de organismos é preliminar e poderá ser alterada diretamente no código em R do *specmine* para a identificação dos metabólitos em outros grupos biológicos, de forma que a expansão do banco não afetará a sua especificidade. A escolha dos scores para essa classificação está apresentada no item 6.3.1.4.

6.3.1.3 *Deslocamento químico diferenciado para diferentes solventes*

A Tabela 15 expõe uma das fragilidades do método de identificação automática adotado que é o pequeno número de espectros ^1H -RMN que tenham sido adquiridos nas mesmas condições (i.e, solvente) que as amostras biológicas testadas. Apesar de bem estabelecida a importância da padronização do ambiente químico na aquisição dos espectros ^1H -RMN que podem alterar os deslocamentos químicos (δ) das ressonâncias ^1H e a resolução espectral (BEYER; SCHOLLMAYER; HOLZGRABE, 2010), ainda são poucos os trabalhos que abordam as diferenças promovidas pela escolha do solvente nesses deslocamentos, principalmente se considerados grupos de prótons (e.g., álcoois, aminas, ácidos e moléculas aromáticas, entre outros) separadamente (ABRAHAM et al., 2006; CUBBERLEY; IVERSON, 2001). O entendimento dessas diferenças é desejável para prever os desvios e possibilitar que métodos bioinformáticos utilizem espectros adquiridos em outras condições (i.e, solvente, pH) com maior precisão.

Por exemplo, quando consideramos a abordagem analítica baseada no espectro de referência do EE2 disponível em banco de dados externo, i.e. Banco de Dados do Metaboloma Humano (HMDB0001926, CDCl_3 como solvente) para a identificação automática de metabólitos, o algoritmo desenvolvido não foi capaz de identificar o estrógeno especificado nas amostras de exometaboloma estudadas. A identificação do metabólito só foi positiva quando o espectro do OUR Database foi adicionado à biblioteca utilizada. Isso ocorre porque a eficiência para detectar o composto alvo em amostras biológicas é claramente menor para compostos recuperados sob condições distintas das amostras consideradas (e.g., solventes e pH). Algumas dessas diferenças podem ser observadas nos espectros de ^1H -RMN do padrão EE2 adquiridos com diversos solventes, porém nas mesmas condições de frequência de ressonância (500 MHz - ^1H) e temperatura (25°C). As informações que constam na Tabela 18 e na Figura 26 evidenciam que o deslocamento químico

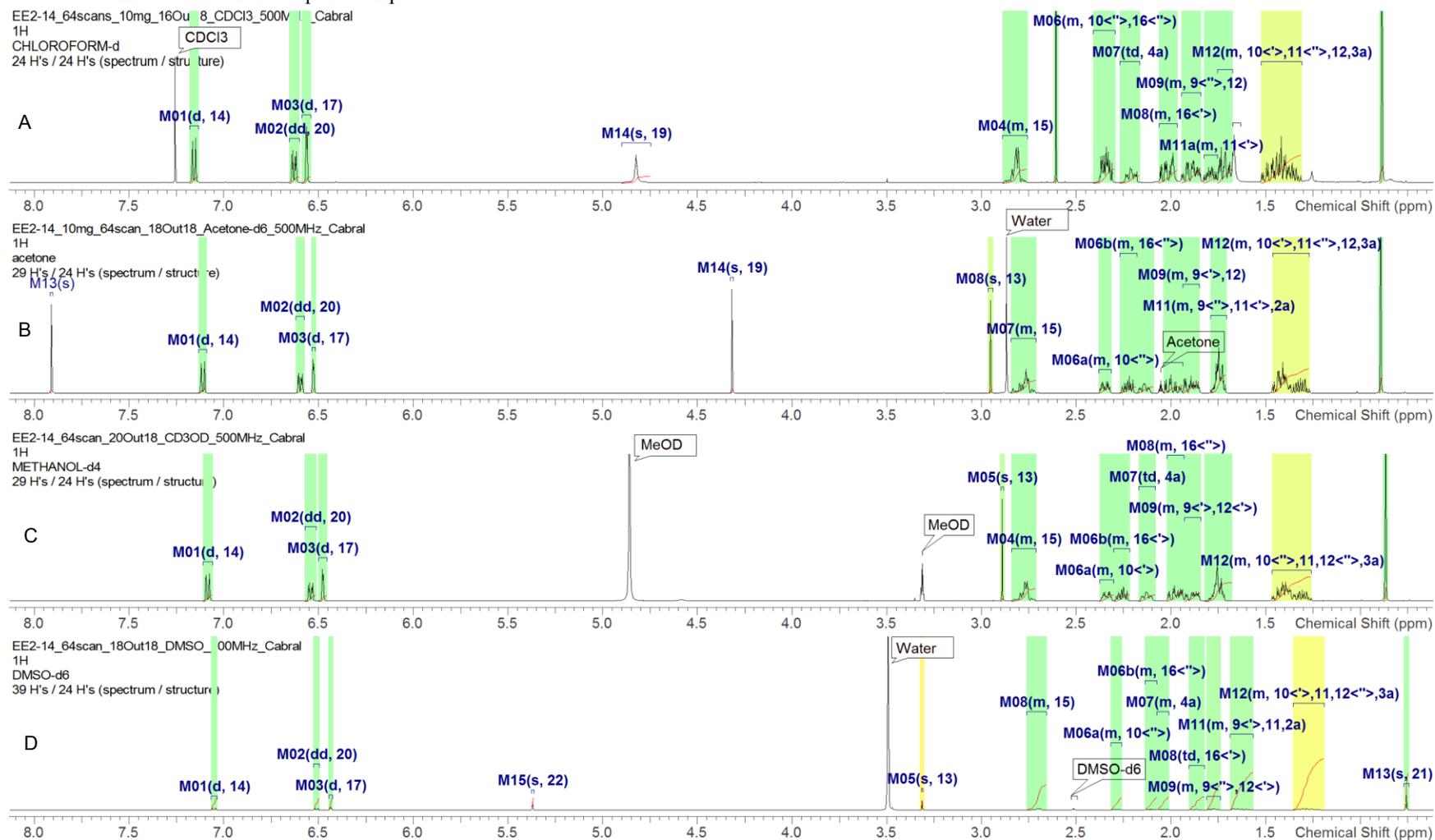
de um mesmo sinal pode ser grande o suficiente para comprometer a identificação de sinais se considerada a janela espectral de 0,1 ppm para o alinhamento de picos espectrais como utilizado neste estudo, ou mesmo 0,03 ppm, conforme utilizado por (MARASCHIN et al., 2012). Entre os solventes clorofórmio e DMSO, foram observados deslocamentos máximos ($\Delta\delta = \delta_{\text{DMSO}} - \delta_{\text{CDCl}_3}$) de -0,17 e 0,71 ppm para os multipletos M07 e M05, respectivamente. Além dos deslocamentos químicos, alterações na multiplicidade dos sinais também podem ser observadas entre os diferentes solvente (Figura 26), podendo ocorrer a sobreposição de dois ou mais sinais como é o caso dos sinais M06a e M06b que em acetona e DMSO aparecem sobrepostos (M06), ou dos sinais M11a e M11b que aparecem sobrepostos em clorofórmio e DMSO (M11). A maioria dos valores de $\Delta\delta$ ($\delta_{\text{DMSO}} - \delta_{\text{CDCl}_3}$) são negativos, a não ser para M05, o que demonstra que além do deslocamento não ser uniforme entre grupos químicos distintos, ele também não é unidirecional. A Figura 27 destaca as diferentes amplitudes encontradas para os sinais do EE2 em espectros adquiridos com as mesmas condições, mas solventes diferentes.

Tabela 18: Atribuição dos átomos e deslocamentos químicos (H_Shift) do EE2 a partir de espectros de ^1H RMN adquiridos em diversos solventes (acetona- d_6 , clorofórmio- d , DMSO- d_6 e metanol- d_4), junto à média e desvio padrão (ppm) para os sinais observados nos quatro solventes.

H_Label	XHn	δ H_Shift (ppm)				Média	Desvio padrão
		EE2_acet	EE2_CDC13	EE2_DMSO	EE2_MeOD		
M05	CH	2.952	2.606	3.314	2.89	2.94	0.29
M07	CH	2.139	2.21	2.041	2.127	2.13	0.07
M13	CH ₃	0.893	0.884	0.755	0.866	0.85	0.06
M12	CH, CH ₂	1.388	1.419	1.283	1.376	1.37	0.06
M08	CH ₂	1.997	2.019	2.103	1.974	2.02	0.06
M03	CH	6.529	6.563	6.437	6.478	6.50	0.06
M02	CH	6.597	6.63	6.512	6.542	6.57	0.05
M04	CH ₂	2.766	2.816	2.705	2.769	2.76	0.05
M01	CH	7.111	7.158	7.053	7.086	7.10	0.04
M09	CH ₂	1.885	1.883	1.867	1.88	1.88	0.01
M06	CH ₂	NA	2.342	NA	NA	--	--
M06a	CH ₂	2.347	NA	2.287	2.338	--	--
M06b	CH ₂	2.225	NA	NA	2.258	--	--
M11	CH, CH ₂	1.746	NA	NA	1.754	--	--
M11a	CH ₂	NA	1.793	1.775	NA	--	--
M11b	CH, CH ₂	NA	1.716	1.639	NA	--	--
M15	OH	7.911	NA	5.37	NA	--	--
M14	OH	4.317	4.824	NA	NA	--	--

Fonte: Autor.

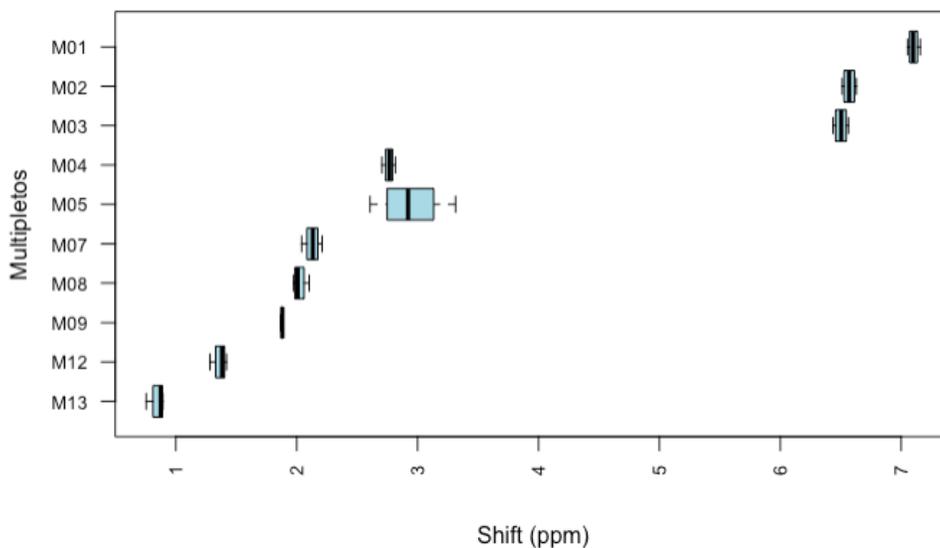
Figura 26: Espectros de ^1H RMN do EE2 adquiridos nos solventes (A) clorofórmio-d; B) acetona-d₆; (C) metanol-d₄; e (D) DMSO-d₆, e atribuições aos átomos de referência daquele composto.



Fonte: Autor.

Comparando ainda os espectros da Figura 26, pode-se perceber facilmente que, dentre os solventes comparados, o DMSO não configura um bom solvente para o EE2. A escolha do solvente deve considerar a polaridade, a natureza hidrofóbica e o teor de água do composto a ser analisado (DORDICK, 1992). Abraham e colaboradores (2006) analisaram o deslocamento químico de compostos orgânicos em DMSO e em clorofórmio e encontraram variações aproximadas às observadas para o EE2 nos mesmos solventes (Tabela 18). Para a maioria dos compostos polares apróticos (i.e., alifático/aromático, amins, eters, cetonas e ésteres), os autores encontraram $\Delta\delta \pm 0.1$ ppm para a grande maioria das ressonâncias, como observado para EE2. Em compostos polares (i.e., alcanos, alcenos, alcinos e aromáticos), a $\Delta\delta$ foi menor pra grande maioria dos compostos, com exceção do próton acetilênico do composto fenilacetileno, cuja diferença no deslocamento entre os solventes chegou a 1.13 ppm ($\Delta\delta$). No entanto, as maiores $\Delta\delta$ foram relatadas para compostos próticos (i.e., amins primárias e secundárias alifáticas e aromáticas, álcoois, tióis, aldeídos, ácidos carboxílicos e amidas) com $\Delta\delta$ variando de 1-4 ppm positivos.

Figura 27: Amplitude dos deslocamentos para cada sinal característico do EE2 nos diferentes solventes.



Fonte: Autor.

Considerando o metanol como solvente de referência, pode-se inferir que para as ressonâncias atribuídas para o EE2, as menores diferenças no deslocamento químico ($\Delta\delta$) foram observadas para a acetona ($\Delta_{MA} = \delta \text{ metanol} - \delta \text{ acetona}$) com Δ_{MA} menores que $\pm 0,06$ ppm em todos os sinais (de -0,06 a 0,03 ppm), seguido do clorofórmio ($\Delta_{MA} = \delta \text{ metanol} - \delta \text{ clorofórmio}$)

com Δ_{MC} menor que -0,09 ppm para quase todas as ressonâncias, salvo para M05 com valor de 0,28 ppm positivo. Em relação ao metanol, o solvente DMSO apresentou a maior diferença entre os deslocamentos ($\Delta_{MD} = \delta_{\text{metanol}} - \delta_{\text{DMSO}}$), com Δ_{MD} variando de -0,42 a 0,11 ppm. A partir dessas observações, os valores de *scores* foram definidos (Quadro 3) e inseridos no algoritmo utilizado para a identificação automática dos compostos nas amostras de *Ulva lactuca*. Considerando que a janela para a correspondência dos picos foi estabelecida em 0,1 ppm, as alterações decorrentes do efeito do solvente podem comprometer a identificação dos compostos, ainda mais em matrizes complexas, nas quais a sobreposição de sinais é comumente observada (LEWIS et al., 2008).

6.3.1.4 Definição dos parâmetros para otimização do algoritmo do *specmine* para a identificação de metabólitos

Durante o desenvolvimento desta tese, e após a elaboração do AD_SPCM, uma série de parâmetros foram acrescentados às funções pré-existentes voltadas à identificação de metabólitos por meio de dados de RMN no *package specmine*. Dentre estes parâmetros, destacam-se os valores atribuídos às diferentes classes de organismos, solventes e frequência dos espectros no conjunto de dados do AD_SPCM. Por meio da função *scoring*, valores diferenciados foram atribuídos a cada classe conforme o que segue

O repositório do HMDB continua a ser acessado de forma integrada ao AD_SPCM, garantindo que metabólitos que não tenham sido referenciados para algas não deixem de ser contemplados. O valor da pontuação atribuída a estes compostos é bem mais baixa que para os demais compostos, orientando o usuário do sistema quanto às chances de aquele ser um metabólito realmente presente naquele organismo. Uma vez alterado o modelo biológico, estas pontuações poderão ser revistas e adaptadas à pesquisa em questão, desde que fornecidos os metadados espectrais necessários.

Atualmente o algoritmo não retorna a informação bibliográfica que referencia um dado metabólito de interesse ao organismo estudado, mas uma vez que os dados sobre as publicações encontram-se no banco, a alteração poderá ser feita futuramente. O *package specmine* foi

desenvolvido pelo Grupo Biosystems, em colaboração com a UFSC (COSTA; MARASCHIN; ROCHA, 2017) e tem sido continuamente adaptado às novas demandas analíticas.

Quadro 3: Critérios para a atribuição de *score* utilizado pelo algoritmo para identificação de compostos.

Organismo:

- Se referenciado na bibliografia para *Ulva* spp.: 1.0
- Se categorizado como “Green Algae” no Kegg: 0.9
- Se referenciado na bibliografia como “outras algas verdes”: 0.8
- Se categorizado no Kegg ou referenciado na bibliografia com “Algae”: 0.6
- Se categorizado somente para organismos que não são algas: 0.1

Solvente:

- Se CD₃OD-d₄: 1.0
- Se Acetona-d₆ ou Etanol: 0.8
- Se CDCl₃ ou CD₂Cl₂: 0.7
- Se D₂O ou DMSO-d₆: 0.6
- Se C₆D₆, CD₃CN ou CD₂Cl₄: 0.2

Frequência:

- Se 400 MHz: 0.8
- Se 500 MHz: 1.0
- Se 600 MHz: 0.8
- Se 700 MHz: 0.6

Fonte: Autor.

6.3.1.5 Compostos identificados no endometaboloma

A seguir estão apresentados os 15 primeiros compostos conforme disponibilizado pelo modelo atual para o endometaboloma da espécie *Ulva lactuca* (MExp_2) de forma distinta para as regiões aromáticas, anoméricas e alifáticas. Cabe salientar que o modelo ainda retorna metabólitos muito improváveis de ocorrerem, como é o caso de nicotina. Neste caso, o composto aparece referenciado com score igual a 0,9 para a classe “organismos”, ou seja, está referenciado no Kegg como um composto que tem algum papel no metabolismo de algas. Nenhuma referência sobre a produção natural de nicotina por algas foi encontrada, no entanto ensaios sobre os efeitos da nicotina em microalgas (FAZELI et al., 2009) podem ser o motivo para que este analito esteja

classificado no Kegg como um composto com papel no metabolismo algal, de forma que, apesar de ter muita informação, utilizar banco do Kegg de forma exclusiva para o ranqueamento pode acarretar em diversas incoerências na lista de metabólitos gerada e maior tempo de conferência manual *a posteriori*.

Os resultados da identificação nas tabelas abaixo aparecem como uma lista de metabólitos com diversas classes de ranqueamento (*scores*), de forma que o usuário do sistema possa optar por retirar dos resultados aqueles compostos com baixo *score*, que representariam identificações com menores chances de acerto. Além dos parâmetros para pontuação listados no Quadro 3, é usado uma pontuação geral referente ao percentual de *matches* dos picos simples do espectro da amostra em relação aos sinais mais próximos ($\pm 0,1$ ppm) referenciados para os padrões.

A duplicata de metabólitos pode acontecer caso mais de um espectro do mesmo composto seja usado para a identificação, como é o caso do ácido oleico identificado na região dos compostos anoméricos (Tabela 20). Nesta região, 44 possíveis metabólitos foram identificados considerando 51 espectros. Já para as regiões anomérica e alifática, esses números aumentam para 195 e 153 possíveis metabólitos, considerando, respectivamente, 234 e 185 espectros. A diferença na quantidade de metabólitos faz jus ao maior número de sinais encontrados nessas regiões, sendo observada a maior sobreposição de ressonâncias na região anomérica.

Tabela 19: Lista dos 15 metabólitos mais prováveis do endometaboloma (MExp_2) ordenados pelos *scores* referentes unicamente ao *match* com picos localizados na região aromática.

SPCMNM	Nome	SPCMNS	score	score_ frequency	score_ solvent	score_ organism	peaks.matched total.peaks	matched_ peaks_ref	matched_ peaks_samp
SPCMNM41592	cis-Coumaric acid	SPCMNS1733	1.000	1	1	1	3 9	7.42; 7.57; 7.6	7.43; 7.55; 7.58
SPCMNM3409	Berberine	SPCMNS997	0.720	0.8	1	0.9	4 17	7.64; 7.98; 8; 8.1	7.62; 7.97; 7.99; 8.07
SPCMNM4350	Anabasine	SPCMNS1034	0.719	0.8	1	0.9	3 86	7.4; 7.85; 7.85	7.43; 7.86; 7.88
SPCMNM4476	Anatabine	SPCMNS1037	0.719	0.8	1	0.9	3 93	7.42; 7.87; 7.87	7.43; 7.86; 7.88
SPCMNM205	keto-phenylpyruvic acid	SPCMNS183	0.640	0.8	1	0.8	5 23	6.48; 7.2; 7.2; 7.75; 7.75	6.46; 7.17; 7.2; 7.73; 7.75
SPCMNM3447	Tryptophanol	SPCMNS1005	0.630	1	0.7	0.9	5 19	7.11; 7.15; 7.21; 7.4; 7.63	7.08; 7.17; 7.2; 7.43; 7.62
SPCMNM1218	Coumarin	SPCMNS659	0.630	1	0.7	0.9	5 20	6.43; 7.53; 7.55; 7.71; 7.73	6.46; 7.55; 7.58; 7.73; 7.75
SPCMNM1238	N-Acetylserotonin	SPCMNS665	0.627	1	0.7	0.9	2 16	7.16; 7.18	7.17; 7.2
SPCMNM3546	salicin	SPCMNS1010	0.617	0.8	1	0.8	2 52	7.2; 7.2	7.17; 7.2
SPCMNM929	L-tryptophan	SPCMNS1415	0.600	1	0.6	1	5 23	7.17; 7.19; 7.52; 7.71; 7.73	7.17; 7.2; 7.55; 7.73; 7.75
SPCMNM5794	Quercetin	SPCMNS1741	0.600	1	1	0.6	4 19	7.6; 7.61; 7.71; 7.72	7.58; 7.62; 7.73; 7.75
SPCMNM870	histamine	SPCMNS559	0.600	1	0.6	1	3 8	7.14; 7.99; 7.99	7.17; 7.97; 7.99
SPCMNM1389	melatonin	SPCMNS1738	0.600	1	1	0.6	3 19	7.05; 7.2; 7.22	7.08; 7.17; 7.2
SPCMNM1248	FAD	SPCMNS666	0.600	1	0.6	1	3 31	7.54; 7.6; 7.85	7.55; 7.58; 7.86
SPCMNM11718	4-Hydroxybenzaldehyde	SPCMNS1595	0.600	1	0.6	1	2 5	7.754; 7.77	7.73; 7.75

Fonte: Autor.

SPCMNM = referência de anotação do metabólito; SPCMNS = referência de anotação do espectro ¹H-RMN; Nome = nome dos metabólitos; score = valores atribuídos ao *match* de picos simples; score_frequency = valores atribuídos à frequência do espectro de referência; score_solvent = valores atribuídos ao solvente do espectro de referência; score_organism = valores atribuídos ao organismo para o qual o metabólito em questão foi referenciado; peaks.matched | total.peaks = o número de picos que fizeram *match* e o total de picos do padrão de referência; matched_peaks_ref = picos de referência que deram *match*; matched_peaks_sample = picos das amostras que fizeram *match* com os picos de referência.

Tabela 20: Lista dos 15 metabólitos mais prováveis do endometaboloma (MExp_2) ordenados pelos *scores* referentes unicamente ao *match* com picos localizados na região anomérica.

SPCMNM	Nome	SPCMNS	score	score_ frequency	score_ solvent	score_ organism	peaks.matched total.peaks	matched_ peaks_ref	matched_ peaks_samp
SPCMNM673	linoleic acid	SPCMNS1737	1.000	1	1	1	21 54	0.88; 0.89; 1.26; 1.26; 1.27; 1.28; 1.32; 1.36; 1.55; 1.57; 1.6; 2.03; 2.03; 2.04; 2.07; 2.24; 2.26; 2.27; 2.75; 2.76; 2.77	0.86; 0.9; 1.23; 1.25; 1.29; 1.31; 1.35; 1.39; 1.56; 1.59; 1.62; 2.01; 2.04; 2.07; 2.1; 2.22; 2.25; 2.28; 2.73; 2.76; 2.8
SPCMNM207	oleic acid	SPCMNS1739	1.000	1	1	1	23 34	0.85; 0.87; 0.88; 1.28; 1.29; 1.3; 1.35; 1.57; 1.58; 1.59; 1.94; 1.95; 1.96; 2; 2.01; 2.05; 2.07; 2.24; 2.26; 2.27; 2.75; 2.76; 2.77	0.84; 0.86; 0.9; 1.25; 1.29; 1.31; 1.35; 1.56; 1.59; 1.62; 1.92; 1.95; 1.98; 2.01; 2.04; 2.07; 2.1; 2.22; 2.25; 2.28; 2.73; 2.76; 2.8
SPCMNM162	L-proline	SPCMNS1740	1.000	1	1	1	14 53	1.91; 1.92; 1.94; 1.95; 1.98; 2.01; 2.07; 2.08; 2.1; 2.13; 2.26; 2.27; 2.28; 2.31	1.9; 1.92; 1.95; 1.98; 2.01; 2.04; 2.07; 2.1; 2.13; 2.16; 2.25; 2.28; 2.31; 2.34
SPCMNM161	L-Alanine	SPCMNS1730	0.993	1	1	1	2 7	1.45; 1.46	1.42; 1.45
SPCMNM688	isovalerylcarniti ne	SPCMNS443	0.800	0.8	1	1	16 39	0.965; 0.967; 2.062; 2.073; 2.085; 2.107; 2.13; 2.24; 2.251; 2.265; 2.284; 2.713; 2.725; 2.741; 2.782; 2.791	0.94; 0.97; 2.04; 2.07; 2.1; 2.13; 2.16; 2.22; 2.25; 2.28; 2.31; 2.7; 2.73; 2.76; 2.8; 2.82
SPCMNM2068	Erucic acid	SPCMNS868	0.800	0.8	1	1	15 22	0.89; 0.9; 0.91; 1.3; 1.34; 1.57; 1.58; 1.59; 2.01; 2.02; 2.03; 2.04; 2.26; 2.27; 2.28	0.86; 0.9; 0.94; 1.29; 1.31; 1.56; 1.59; 1.62; 1.98; 2.01; 2.04; 2.07; 2.25; 2.28; 2.31
SPCMNM252	Sphingosine	SPCMNS230	0.720	0.8	1	0.9	16 57	0.88; 0.9; 0.91; 1.29; 1.31; 1.32; 1.39; 1.4; 1.42; 2.06; 2.07; 2.08; 2.1; 2.73; 2.74; 2.74	0.86; 0.9; 0.94; 1.29; 1.31; 1.35; 1.39; 1.42; 1.45; 2.04; 2.07; 2.1; 2.13; 2.7; 2.73; 2.76
SPCMNM1067	N- Acetylaspartylgl utamic acid	SPCMNS633	0.720	0.8	1	0.9	19 42	1.92; 1.94; 1.94; 1.95; 1.98; 2.17; 2.18; 2.19; 2.22; 2.39; 2.4; 2.42; 2.68; 2.69; 2.7; 2.72; 2.8; 2.81; 2.83	1.9; 1.92; 1.95; 1.98; 2.01; 2.16; 2.18; 2.22; 2.25; 2.37; 2.4; 2.43; 2.65; 2.68; 2.7; 2.73; 2.8; 2.82; 2.85

SPCMNM	Nome	SPCMNS	score	score_ frequency	score_ solvent	score_ organism	peaks.matched total.peaks	matched_ peaks_ref	matched_ peaks_samp
SPCMNM4350	Anabasine	SPCMNS1034	0.720	0.8	1	0.9	18 86	1.52; 1.53; 1.56; 1.59; 1.63; 1.67; 1.69; 1.8; 1.81; 1.82; 1.92; 1.92; 1.92; 1.95; 2.76; 2.77; 2.78; 2.79	1.51; 1.56; 1.59; 1.62; 1.65; 1.7; 1.72; 1.79; 1.81; 1.85; 1.9; 1.92; 1.95; 1.98; 2.73; 2.76; 2.8; 2.82
SPCMNM3573	Scopolamine	SPCMNS1012	0.720	0.8	1	0.9	10 66	1.81; 1.84; 2.02; 2.05; 2.38; 2.39; 2.41; 2.44; 2.46; 2.83	1.79; 1.81; 2.01; 2.04; 2.37; 2.4; 2.43; 2.46; 2.49; 2.8
SPCMNM207	oleic acid	SPCMNS185	0.700	1	0.7	1	13 16	0.88; 0.89; 1.28; 1.32; 1.61; 1.63; 1.64; 1.67; 2.02; 2.03; 2.34; 2.36; 2.37	0.86; 0.9; 1.25; 1.29; 1.59; 1.62; 1.65; 1.7; 2.01; 2.04; 2.31; 2.34; 2.37
SPCMNM220	hexadecanoic acid	SPCMNS200	0.700	1	0.7	1	9 11	0.88; 0.89; 1.22; 1.23; 1.26; 1.64; 2.34; 2.36; 2.37	0.86; 0.9; 1.23; 1.25; 1.29; 1.62; 2.31; 2.34; 2.37
SPCMNM573	Elaidic acid	SPCMNS384	0.700	1	0.7	1	13 16	0.88; 0.89; 1.28; 1.32; 1.61; 1.63; 1.64; 1.67; 2.02; 2.03; 2.34; 2.36; 2.37	0.86; 0.9; 1.25; 1.29; 1.59; 1.62; 1.65; 1.7; 2.01; 2.04; 2.31; 2.34; 2.37
SPCMNM806	tetradecanoic acid	SPCMNS530	0.700	1	0.7	1	9 11	0.88; 0.89; 1.61; 1.63; 1.64; 1.67; 2.34; 2.36; 2.37	0.86; 0.9; 1.59; 1.62; 1.65; 1.7; 2.31; 2.34; 2.37
SPCMNM826	Pentadecanoic acid	SPCMNS540	0.700	1	0.7	1	14 15	0.87; 0.89; 0.9; 1.26; 1.31; 1.34; 1.36; 1.61; 1.63; 1.64; 1.67; 2.34; 2.36; 2.37	0.84; 0.86; 0.9; 1.23; 1.29; 1.31; 1.35; 1.59; 1.62; 1.65; 1.7; 2.31; 2.34; 2.37

Fonte: Autor.

SPCMNM = referência de anotação do metabólito; SPCMNS = referência de anotação do espectro ¹H-RMN; Nome = nome dos metabólitos; score = valores atribuídos ao *match* de picos simples; score_frequency = valores atribuídos à frequência do espectro de referência; score_solvent = valores atribuídos ao solvente do espectro de referência; score_organism = valores atribuídos ao organismo para o qual o metabólito em questão foi referenciado; peaks.matched | total.peaks = o número de picos que fizeram *match* e o total de picos do padrão de referência; matched_peaks_ref = picos de referência que deram *match*; matched_peaks_sample = picos das amostras que fizeram *match* com os picos de referência.

Tabela 21: Lista dos 15 metabólitos mais prováveis do endometaboloma (MExp_2) ordenados pelos *scores* referentes unicamente ao *match* com picos localizados na região alifática.

SPCMNM	Nome	SPCMNS	score	score_ frequency	score_ solvene	score_ organism	peaks.matched total.peaks	matched_ peaks_ref	matched_ peaks_samp
SPCMNM660	D-fructose	SPCMNS1735	1.000	1	1	1	21 62	3.35; 3.39; 3.42; 3.46; 3.47; 3.48; 3.51; 3.54; 3.57; 3.6; 3.63; 3.66; 3.7; 3.73; 3.75; 3.78; 3.81; 3.84; 3.87; 4.01; 4.01; 4.03; 4.05; 4.57	3.34; 3.36; 3.39; 3.45; 3.48; 3.51; 3.54; 3.57; 3.6; 3.63; 3.66; 3.69; 3.72; 3.75; 3.78; 3.81; 3.84; 3.87; 3.9; 3.99; 4.02; 4.05; 4.08; 4.58
SPCMNM122	glucose	SPCMNS1736	1.000	1	1	1	23 21	3.28; 3.34; 3.35; 3.36; 3.65; 3.67; 3.68; 3.69; 3.76; 3.77; 3.78	3.25; 3.34; 3.36; 3.39; 3.63; 3.66; 3.69; 3.72; 3.75; 3.78; 3.81
SPCMNM162	L-proline	SPCMNS1740	1.000	1	1	1	14 53	3.21; 3.22; 3.23; 3.36; 3.37; 3.38; 3.39; 3.96; 3.97; 3.98; 3.99	3.2; 3.23; 3.25; 3.34; 3.36; 3.39; 3.42; 3.93; 3.96; 3.99; 4.02
SPCMNM161	L-Alanine	SPCMNS1730	1.000	1	1	1	2 7	3.35; 3.55; 3.57; 3.58; 3.6	3.34; 3.54; 3.57; 3.6; 3.63
SPCMNM673	linoleic acid	SPCMNS1737	1.000	1	1	1	16 54	5.27; 5.31; 5.34; 5.37	5.3; 5.34; 5.37; 5.4
SPCMNM207	oleic acid	SPCMNS1739	0.999	1	1	1	15 34	5.32; 5.32; 5.34	5.3; 5.34; 5.37
SPCMNM688	isovalerylcarnitine	SPCMNS443	0.800	0.8	1	1	16 39	3.198; 3.694; 3.695; 3.842; 3.856; 3.88	3.2; 3.69; 3.72; 3.84; 3.87; 3.9
SPCMNM2068	Erucic acid	SPCMNS868	0.800	0.8	1	1	19 22	5.31; 5.33; 5.34	5.3; 5.34; 5.37
SPCMNM4476	Anatabine	SPCMNS1037	0.720	0.8	1	0.9	18 93	3.38; 3.38; 3.39; 3.42; 3.52; 3.52; 3.54; 3.57; 3.91; 3.92; 3.93	3.36; 3.39; 3.42; 3.45; 3.51; 3.54; 3.57; 3.6; 3.9; 3.93; 3.96
SPCMNM252	Sphingosine	SPCMNS230	0.720	0.8	1	0.9	10 57	3.47; 3.48; 3.49; 3.65; 3.66; 3.67; 3.95; 3.96; 3.97	3.45; 3.48; 3.51; 3.63; 3.66; 3.69; 3.93; 3.96; 3.99
SPCMNM3573	Scopolamine	SPCMNS1012	0.720	0.8	1	0.9	13 66	3.27; 3.78; 3.79; 3.8; 3.81; 3.84; 3.9; 4.13; 4.14	3.25; 3.75; 3.78; 3.81; 3.84; 3.87; 3.9; 4.13; 4.17
SPCMNM693	Heparan sulfate	SPCMNS447	0.720	0.8	1	0.9	9 6	3.27; 3.82; 4.56; 4.58	3.25; 3.81; 4.53; 4.58

SPCMNM	Nome	SPCMNS	score	score_ frequency	score_ solvene	score_ organism	peaks.matched total.peaks	matched_ peaks_ref	matched_ peaks_samp
SPCMNM3409	Berberine	SPCMNS997	0.720	0.8	1	0.9	13 17	3.24; 3.25; 4.1; 4.2	3.23; 3.25; 4.08; 4.17
SPCMNM4350	Anabasine	SPCMNS1034	0.720	0.8	1	0.9	9 86	3.13; 3.68; 3.69; 3.7	3.13; 3.66; 3.69; 3.72
SPCMNM937	Stigmasta-5,22-dien- 3 β -ol	SPCMNS604	0.700	1	0.7	1	14 64	3.51; 3.52; 3.53; 3.54; 5.36	3.48; 3.51; 3.54; 3.57; 5.34

Fonte: Autor.

SPCMNM = referência de anotação do metabólito; SPCMNS = referência de anotação do espectro ¹H-RMN; Nome = nome dos metabólitos; score = valores atribuídos ao *match* de picos simples; score_frequency = valores atribuídos à frequência do espectro de referência; score_solvent = valores atribuídos ao solvente do espectro de referência; score_organismo = valores atribuídos ao organismo para o qual o metabólito em questão foi referenciado; peaks.matched | total.peaks = o número de picos que fizeram *match* e o total de picos do padrão de referência; matched_peaks_ref = picos de referência que deram *match*; matched_peaks_sample = picos das amostras que fizeram *match* com os picos de referência.

Apesar de fucosterol ser frequentemente relatado com o esteroide predominante em *U. lactuca* (KAPETANOVIC et al., 2005), este composto não foi identificado como possível metabólito pelo algoritmo. Dos principais esteróides identificados para esta espécie (AWAD, 2000; KAPETANOVIC et al., 2005), apenas Stigmasta-5,22-dien-3 β -ol (SPCMNM937) e Colesterol (SPCMNM67) foram sugeridos pela identificação automatizada. Em estudo para a definição da composição de esteróides de espécies de macroalgas, Kapetanovic e colaboradores (2005) encontraram colesterol com contribuição expressiva de 34% do total de esteróides, enquanto Stigmasta-5,22-dien-3 β -ol contribuiu com apenas 4%. A proporção entre esses compostos, no entanto, pode variar de acordo com a salinidade, temperatura e poluentes (KAPETANOVIC et al., 2005; POPOV et al., 1985). Popov e colaboradores (1985) encontraram significativa relação entre a composição de esteróides em *U. rigida* e águas caracterizadas por poluição antropogênica. Neste estudo, no entanto, a alteração entre as proporções destes compostos mediante a exposição de EE2 não chegou a ser explorada. Os dois compostos citados, foram sugeridos pelo algoritmo tanto para amostras tratadas (1 e 10 $\mu\text{g/L}$ de EE2, MExp_2) como para amostras controle.

Da mesma forma, ácidos graxos como ácido oleico (SPCMNM207), ácido linoleico (SPCMNM673), ácido α -linolênico (SPCMNM1388) e ácido araquidônico (SPCMNM2212) foram sugeridos como metabólitos independente da concentração de exposição ao EE2, bem como L-prolina (SPCMNM162) e L-alanina (SPCMNM161). Como a identificação automática dos compostos não considera as intensidades dos picos, essa verificação deve ser feita manualmente a partir dos picos apontados nos testes a posteriori como responsáveis pela separação dos grupos.

A não identificação de compostos relatados como sendo majoritários na alga, também pode estar relacionada à ausência de espectros do padrão destes compostos no banco. A especificidade destes compostos dificultam sua identificação nos repositórios digitais de onde os espectros $^1\text{H-RMN}$ foram importados. Como comparativo entre tratamentos, somente compostos que diminuam drasticamente a sua concentração ou que passem a ser produzidos em função da condição de tratamento, seriam destacados. Uma vez presentes na amostra, independente da concentração do composto (desde que acima do LOD), o resultado será praticamente o mesmo em todos os tratamentos, ainda mais em ensaios onde as diferenças entre tratamentos são discretas, como foi observado neste estudo.

6.3.2 Identificação do EE2 (MExp_1)

Os efeitos do 17 α -etinilestradiol no metaboloma da *Ulva lactuca* foram avaliados no tecido de algas (endometaboloma) e no meio de cultura (exometaboloma). Como primeira abordagem, buscou-se identificar a presença do xenobiótico nas amostras por meio da espectroscopia de ¹H-RMN para a análise em matriz complexa. O algoritmo usado identificou eficientemente o analito EE2 somente em extratos de exometaboloma, usando correlações de ressonâncias aromáticas de ¹H (6,3, 6,46 e 7,07 ppm) observadas nos espectros de RMN do padrão xenobiótico e nas amostras do endo- e exometaboloma das algas. Por meio dessa mesma abordagem, as demais ressonâncias do padrão EE2 também foram correlacionadas com os picos de referência de outros metabólitos.

O EE2 não foi identificado nas amostras de controle do endo- e exometaboloma, reforçando a coerência do método. Nas amostras de exometaboloma expostas ao EE2 foi observada uma correlação de 72% (0h) e 46% (48h) para os sinais de ¹H RMN dos extratos e do padrão de EE2 identificados, que pode indicar a diminuição do hormônio no meio ao longo do tempo. Devido à alta porcentagem de picos de EE2 nas regiões anoméricas e alifáticas que coincidem com as ressonâncias da maioria de metabólitos das amostras biológicas, o conjunto de dados ¹H RMN foi filtrado, de forma que o algoritmo considera como identificados apenas aqueles metabólitos com pontuação (*score*) maior que 0,05. Deste modo, a ressonância a 6,46 ppm foi correlacionada somente ao EE2, alcançando pontuação mais alta em relação aos demais sinais para o match (0,1 ppm). Outros dois sinais, a 6,52 ppm e a 7,07 ppm, também foram atribuídos ao EE2 nos espectros de ¹H RMN do exometaboloma das amostras expostas. Amostras de algas coletadas no tempo 0 h também apresentaram intensidades de picos correspondentes ao EE2 maiores que as coletadas após 48 h de exposição, reforçando a possibilidade da degradação/metabolização deste composto.

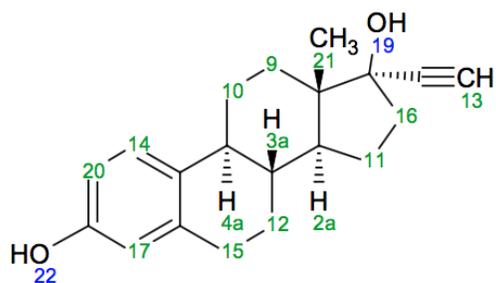
A detecção do EE2 apenas no exometaboloma não difere do relatado para a maioria das espécies de macro ou microalgas testadas (Tabela 4, da Revisão Bibliográfica). Mesmo em estudos onde a biotransformação do estrógeno pôde ser observada, não foi identificado o EE2 no endometaboloma das algas (DELLA GRECA et al., 2008). Dos estudos revisados, apenas Liu et al. (2010) e Maes et al. (2014) relataram a assimilação do EE2, excluindo-se a possibilidade do efeito de adsorção às células. Estimativas de assimilação de até 31% pela diatomácea *Navicula*

salinicola (exposição 0,1 μg EE2/L) e de 68% por *Desmodesmus subspicatus* (Chlorophyta – exposição 20 μg /L, 72 h) foram realizadas por aqueles autores.

Lai et al. (2002a) concluíram que o EE2 é relativamente estável em cultivos *in vitro* da microalga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta), após exposição por 48 h. Estudos de degradação de estrogênios naturais e sintéticos geralmente destacam a preocupação sobre a meia-vida mais longa do EE2, considerando-o um hormônio estrogênico com maior potencial de disrupção endócrina quando comparado aos naturais, por exemplo, estrona e estradiol (YING; KOOKANA; RU, 2002). A possibilidade de que uma alga cosmopolita com alta plasticidade ambiental possa biotransformar um potente e persistente composto estrógeno parece, de início, animadora. Porém, se a eventual toxicidade mais alta dos subprodutos brominados do EE2 (MAES et al., 2014) for confirmada, a presença deste xenobiótico em águas naturais pode ser de maior preocupação do que o previsto. No contexto deste estudo, permanece a necessidade de confirmar por quais meios o EE2 teria sido reduzido na fase aquosa. Além disso, destaca-se a importância de desvendar não apenas os efeitos do EE2 na alga, mas sua interação global no meio ambiente.

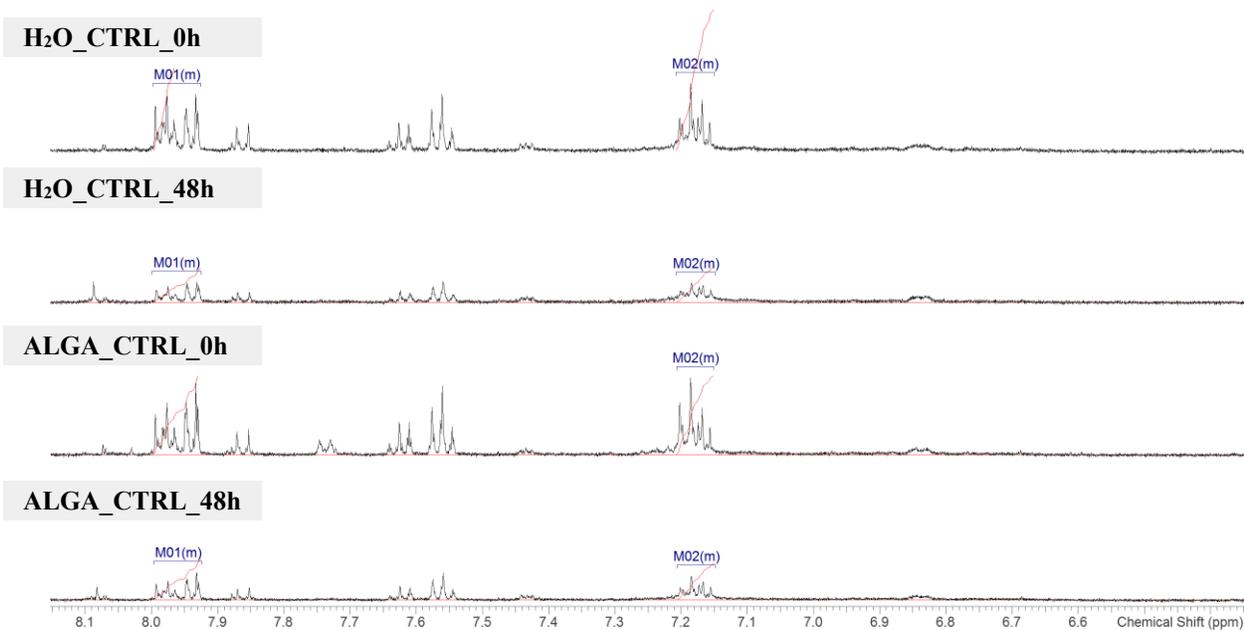
Nas figuras abaixo (Figura 29 a Figura 34), os espectros das amostras controle (Figuras Figura 29Figura 31Figura 33) e tratadas (Figuras Figura 30; Figura 32; Figura 34) do exometaboloma nos tempos amostrais 0h e 48h podem ser observados. A análise visual confirma o que foi revelado na análise por meio do algoritmo e, principalmente na região aromática (Figura 30), a presença do hormônio nas amostras fica evidente e a diminuição da intensidade destes sinais também pode ser percebida entre amostras expostas em 0h e em 48h. As áreas hachuradas referem-se às atribuições das ressonâncias aos prótons referenciados conforme a Figura 28.

Figura 28: Numeração dos átomos de hidrogênio do EE2, conforme apresentação das atribuições na Tabela 18 e Figura 26 (numeração dos átomos sugerida automaticamente pelo software ACD/NMR Processor a partir da designação do composto).



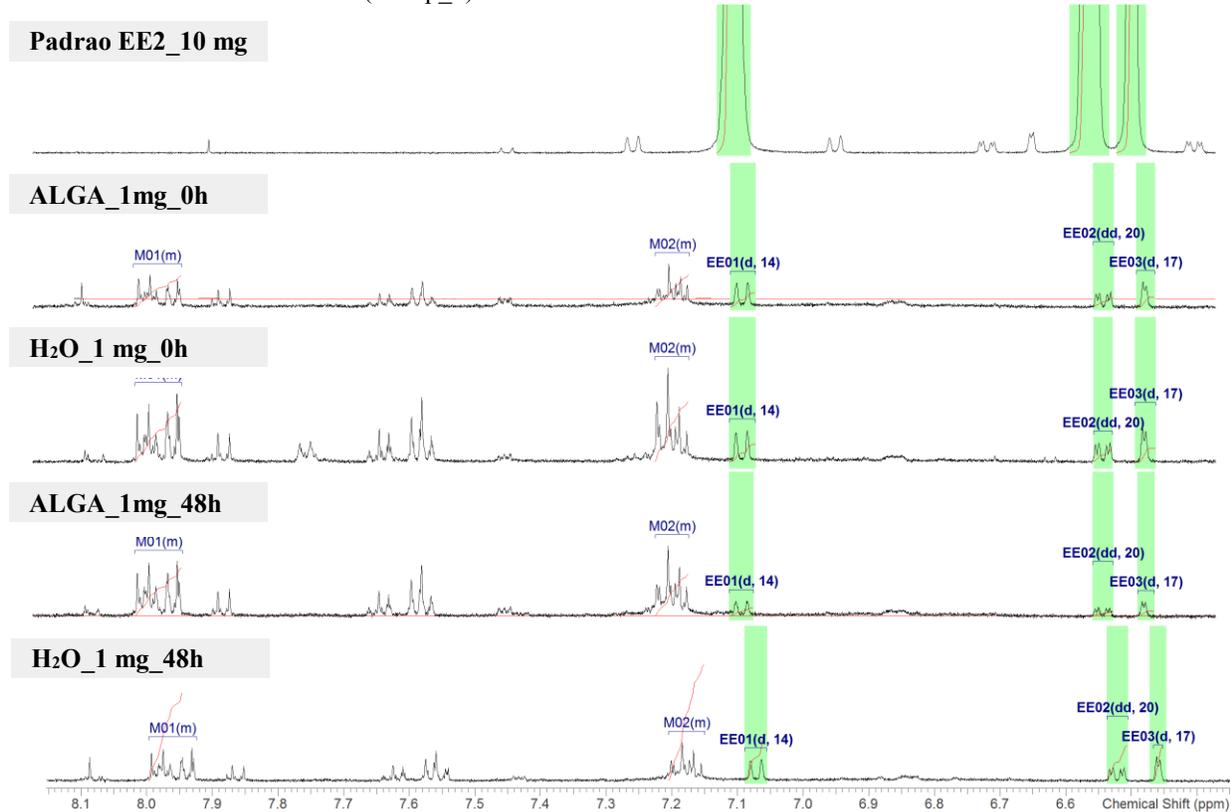
Fonte: Autor (via software ACD/NMR Processor).

Figura 29: Região aromática (5,5-8,5 ppm) das amostras controle sem e com etanol, nos tempos 0 e 48h do exometaboloma (MExp_1).



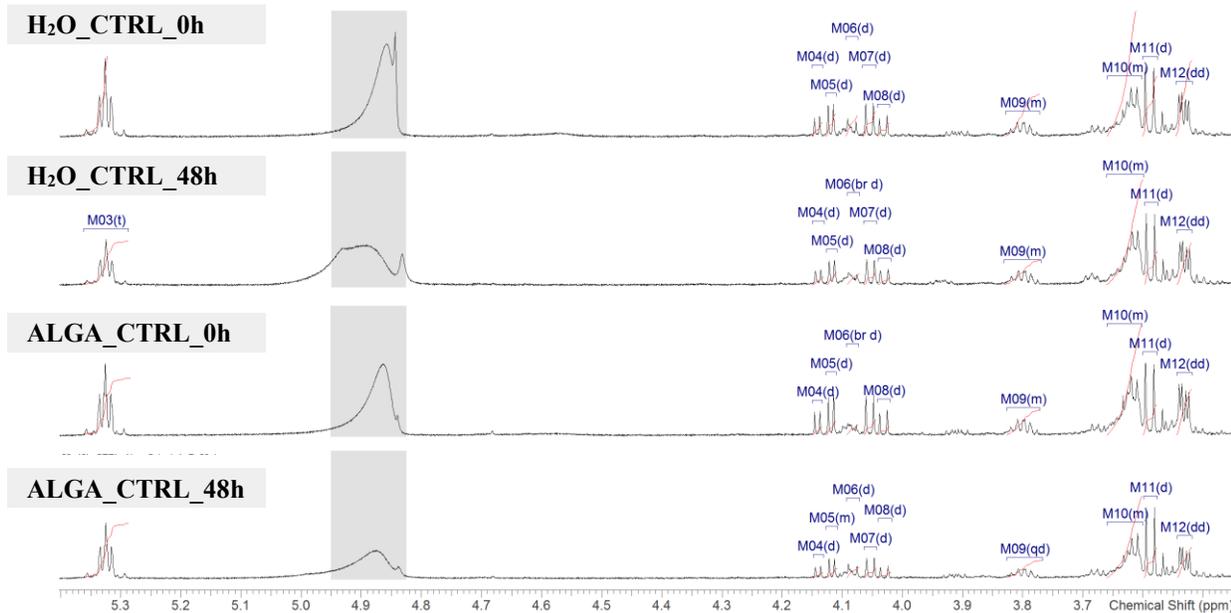
Fonte: Autor

Figura 30: Região aromática (5,5-8,5 ppm) das amostras tratadas com (A) e sem (B) etanol, nos tempos 0 e 48h do exometaboloma (MExp_1).



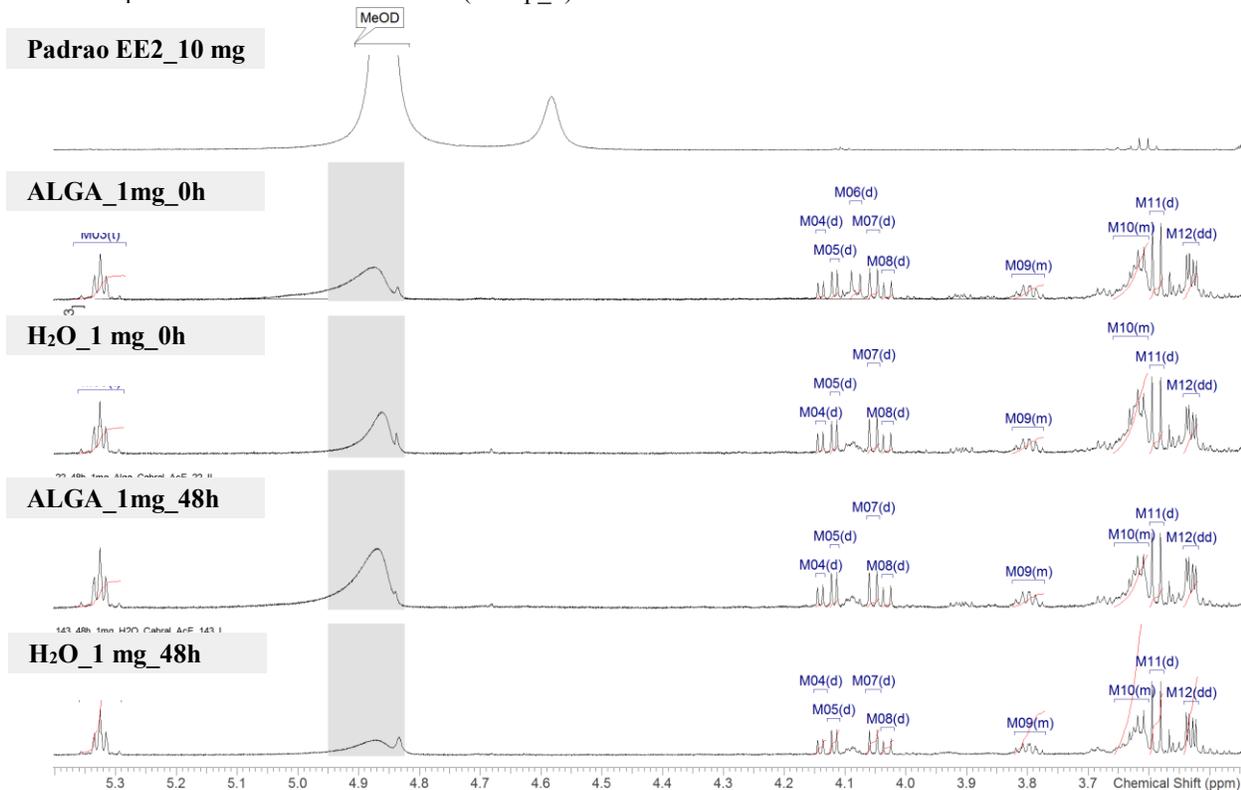
Fonte: Autor

Figura 31: Região anomérica (3-5.5 ppm) das amostras controle sem e com etanol, nos tempos 0 e 48h do exometaboloma (MExp_1).



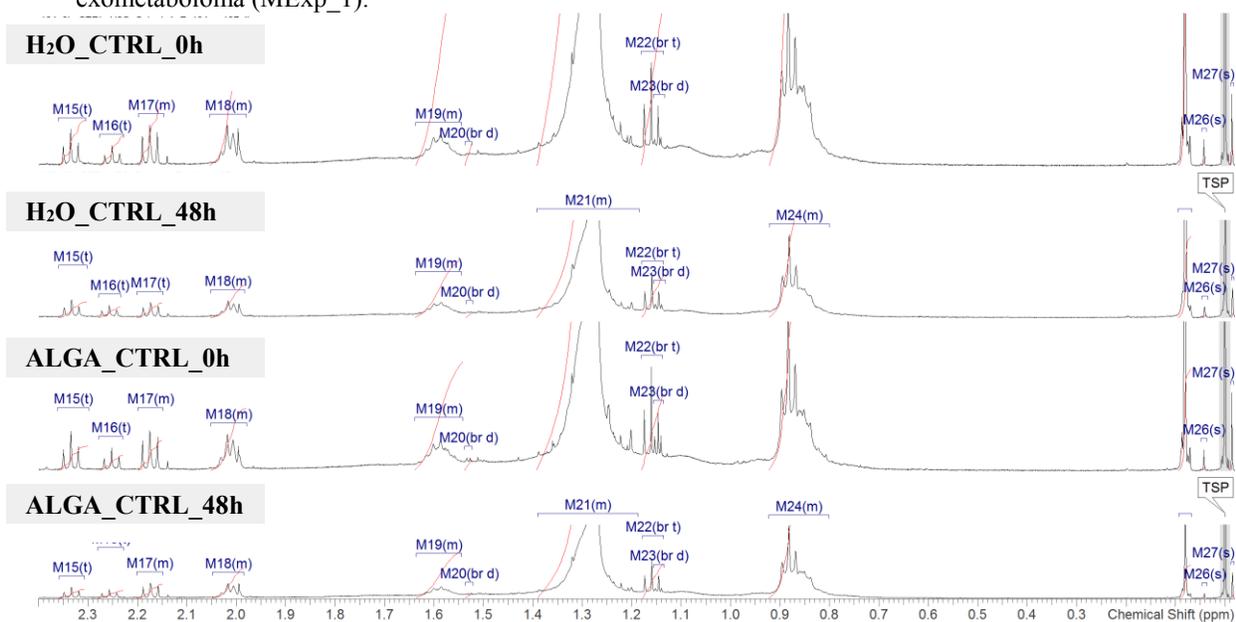
Fonte: Autor

Figura 32: Região anomérica (3-5.5 ppm) das amostras tratadas com (A) sem e (B) com etanol, nos tempos 0 e 48h do exometaboloma (MExp_1).



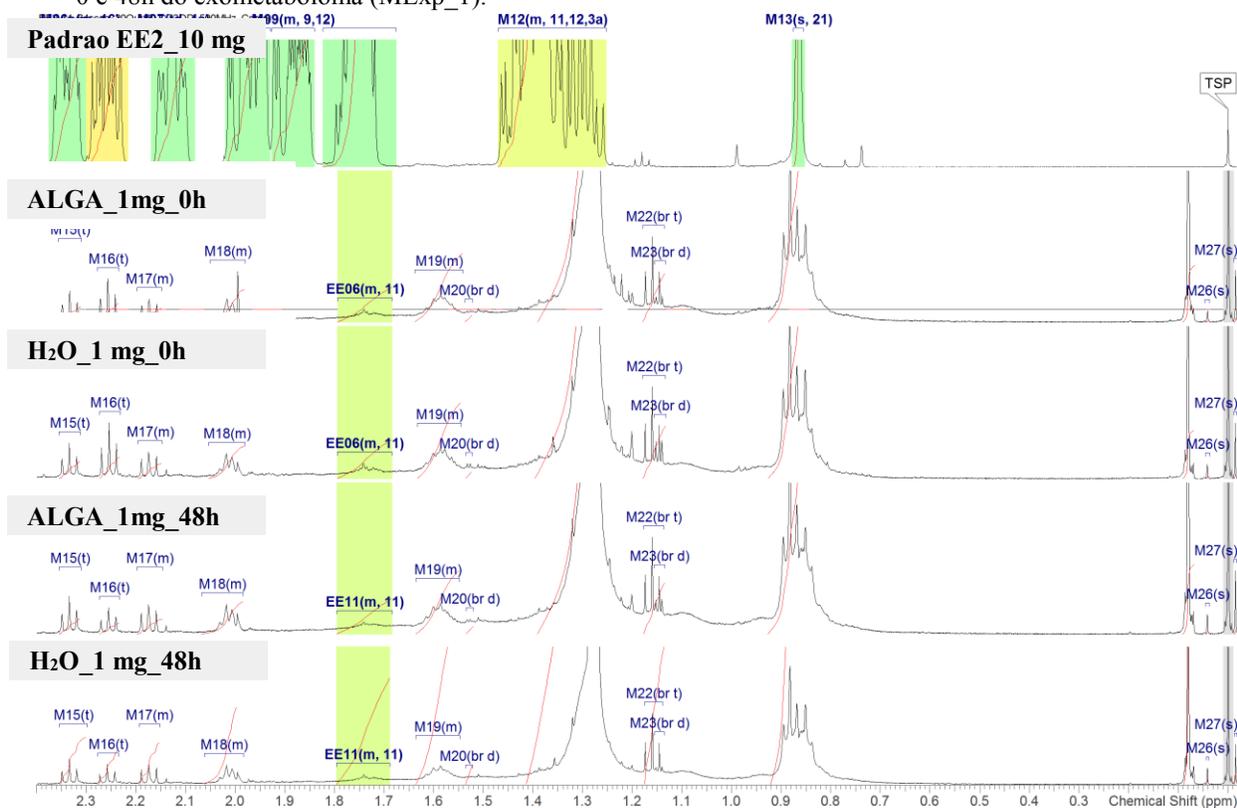
Fonte: Autor.

Figura 33 Região alifática (0-3 ppm) das amostras controle sem e com etanol, nos tempos 0 e 48h do exometaboloma (MExp_1).



Fonte: Autor.

Figura 34 Região alifática (0-3 ppm) das amostras tratadas com (A) sem e (B) com etanol, nos tempos 0 e 48h do exometaboloma (MExp_1).

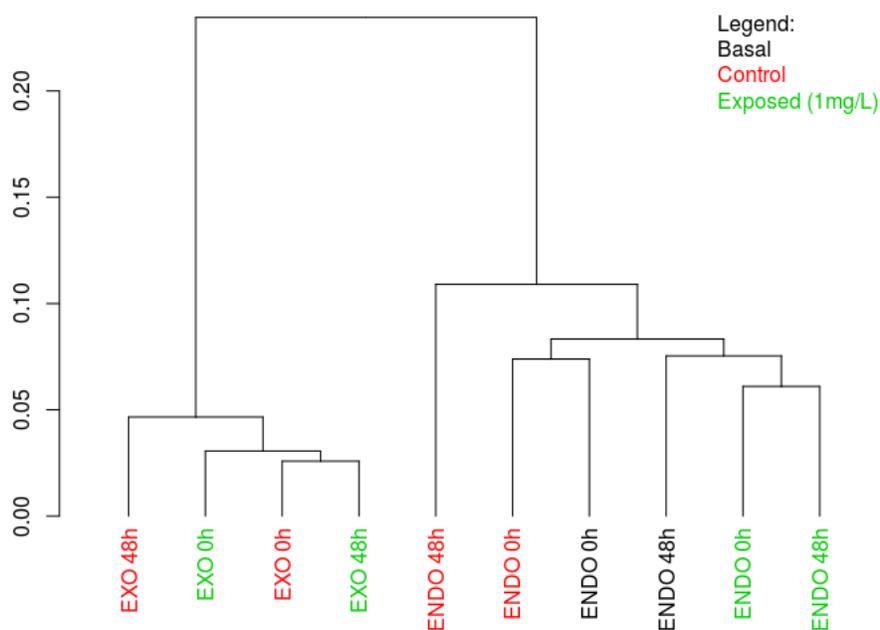


Fonte: Autor.

6.3.3 Análises de agrupamento hierárquico: MExp_1 (EE2, 1 mg/L, 48h)

A análise de agrupamento hierárquico foi aplicada ao conjunto total de dados de ^1H NMR das amostras de endometaboloma e exometaboloma do MExp_1, revelando a existência de dois grupos de perfis metabólicos (Figura 35). Não foram observadas diferenças significativas para os fatores tempo de exposição ou concentração de EE2 nas amostras do endometaboloma e exometaboloma. No entanto, os resultados permitem inferir uma tendência de agrupamento de amostras expostas de acordo com a composição do endometaboloma.

Figura 35: Agrupamento hierárquico resultante da análise de dados de ^1H RMN (0,20 - 13,00 ppm) de amostras de endo- e exometaboloma de *Ulva lactuca* expostas a EE2 por 0h e 48h.



Fonte: Sara Cardoso, Universidade do Minho (em colaboração).

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis também foi empregado para identificar quais ressonâncias foram as mais importantes para promover a discriminação das amostras de endo- e exometaboloma. Ao considerar todas as amostras, 72 das 138 ressonâncias mostraram-se relevantes para o agrupamento ($p > 0,05$). Destes, 10 sinais (1,24; 1,53; 7,17; 7,20; 7,55; 7,57; 7,62; 7,86; 7,94; e 7,97 ppm) apresentaram valores de p inferiores a 0,004, o que destaca o intervalo

entre 7,0 e 8,0 ppm com muitos picos de significância na região aromática com alta dissimilaridade. De estudos relatando exposição, Belhaj et al. (2017) investigaram alterações metabólicas no fitoplâncton exposto ao EE2 e encontraram incrementos de alguns carboidratos e ácidos graxos e a diminuição dos pigmentos fotossintéticos para concentrações de EE2 de 100 e 1000 ng / L. O mesmo padrão foi também observado por Liu et al. (2010).

Os dados dos espectros de ^1H RMN das amostras de endo- e exometaboloma ainda foram analisados separadamente via HCA. O agrupamento de amostras de endometaboloma em função do tempo de exposição ao EE2 foi observado, o mesmo não ocorrendo para o fator concentração do xenobiótico. Por sua vez, as amostras de endometaboloma não apresentaram nenhum padrão de agrupamento consoante aos fatores em estudo.

Esse processamento foi realizado para o endo- e exometaboloma e os resultados dessa análise foram apresentados em conferência pela autora e publicado conforme o que segue (Apêndice A):

Cabral D. et al. (2019) 17 α -Ethinylestradiol Analysis of Endo- and Exometabolome of *Ulva lactuca* (Chlorophyta) by ^1H -NMR Spectroscopy and Bioinformatics Tools. In: Fdez-Riverola F., Mohamad M., Rocha M., De Paz J., González P. (eds) *Practical Applications of Computational Biology and Bioinformatics, 12th International Conference. PACBB2018 2018. Advances in Intelligent Systems and Computing*, vol 803. Springer, Cham. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-98702-6_26. Print ISBN: 978-3-319-98701-9

6.3.3.1 Degradação do EE2 no exometaboloma

Para verificar a possibilidade da degradação do hormônio no exometaboloma ter sido realizada pela alga, uma nova análise com as amostras do exometaboloma foram realizadas considerando as amostras do meio de cultura na presença e na ausência da alga ao longo do tempo. Nesta análise, foram utilizadas somente as ressonâncias atribuídas exclusivamente ao hormônio das amostras tratadas (1 mg/l de EE2). As diferenças entre amostras com ou sem a alga não foram significativas ($p > 0,05$) quando analisadas pelo teste t de Student. Os resultados obtidos levam a crer que a diminuição do estrógeno dá-se em função da fotodegradação (ATKINSON et al., 2011; ZUO; ZHANG; DENG, 2006), que pode ter sido acelerada mediante aeração (REN et al., 2016).

Observando ainda os espectros (Figura 29 a Figura 34), na região anomérica diferenças entre as amostras não são perceptíveis, mas, ainda que discretas, alterações referentes ao tempo de

cultivo podem ser notadas. As intensidades dos picos dos tripletos M15, M16 e M17 da região alifática diminuíam a intensidade de 0h para 48h (sem diferença significativa). Ainda na mesma região, as ressonâncias dos multipletos M19 e M24 aparentam diminuição discreta somente na amostra tratada após 48h, bem como as ressonâncias M22 e M33 (tripleto e dubleto, respectivamente).

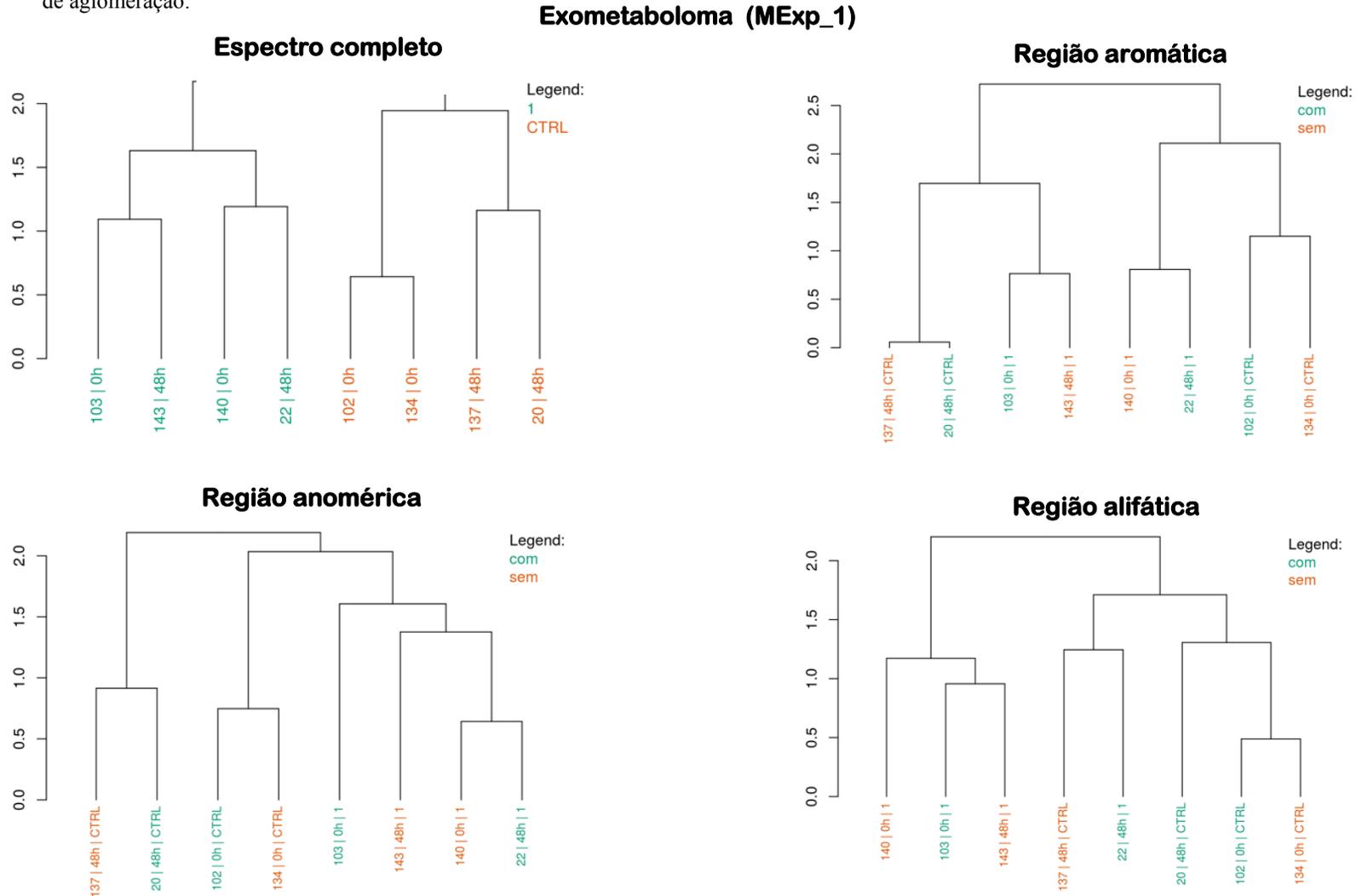
6.3.3.2 Alteração metabólica do exometaboloma

Para verificar a alteração do metaboloma e confirmar ou refutar as impressões da exploração visual dos espectros, a análise hierárquica também foi realizada considerando somente as amostras do exometaboloma (Figura 36). As diferenças entre amostras tratadas e controle são significativas ($p > 0,05$, teste t). A mesma análise foi feita separando as regiões aromática, anomérica e alifática e pode-se perceber as amostras expostas ao EE2 tendem ao agrupamento, principalmente na região alifática, enquanto que o agrupamento entre amostras coletadas em 0h ou em 48h parece mais claro nas amostras da região anomérica. A formação de clusters em função da presença ou ausência da alga não foi observada.

O teste t foi usado para a identificação das principais ressonâncias que influenciaram os agrupamentos observados entre amostras expostas ou não ao hormônio. Considerando o espectro completo, foram identificadas 23 ressonâncias com p menor que 0,05 (i.e., 0,85; 1,38; 1,43; 1,44; 1,72; 1,74; 1,92; 1,94; 1,97; 2,15; 2,19; 2,23; 3,93; 3,98; 4,01; 5,33; 5,36; 6,46; 6,52; 7,08; 7,88). Destas, somente três foram atribuídas ao estrógeno EE2 (6,46; 6,52 e 7,08), de forma que a presença ou ausência das ressonâncias do EE2 não são o único motivo de variação entre as amostras do exometaboloma. Para o endometaboloma, as análises também foram repetidas para cada região do espectro, e o resultado mostrou-se o mesmo, sem a definição de um padrão relacionado às variáveis testadas.

Os diferentes resultados entre as análises do exometaboloma e endometaboloma podem estar também relacionadas aos efeitos do hormônio sobre a comunidade microbiana presente no meio de cultivo. Nos ensaios não foram utilizadas culturas axênicas devido à necessidade da talusina para o desenvolvimento da alga, que é proveniente da sua interação simbiótica com bactérias (MATSUO et al. 2005 apud WICHARD et al., 2015).

Figura 36: Análise hierárquica entre as amostras do exometaboloma (MExp_1) considerando o espectro completo, sendo a discriminação de cores em função da exposição ao EE2 (verde = 1ng/L; laranja = controle) e as regiões aromáticas, anoméricas e alifáticas,. Nestas, o fator discriminante das cores é a presença (verde) ou a ausência (laranja) da alga. A análise considerou como métrica de distância de pearson e as médias como método de aglomeração.



Fonte: Autor.

6.3.4 Análise de agrupamento hierárquico – Mexp_2 (EE2, 100 – 10.000 ng/L, 144h)

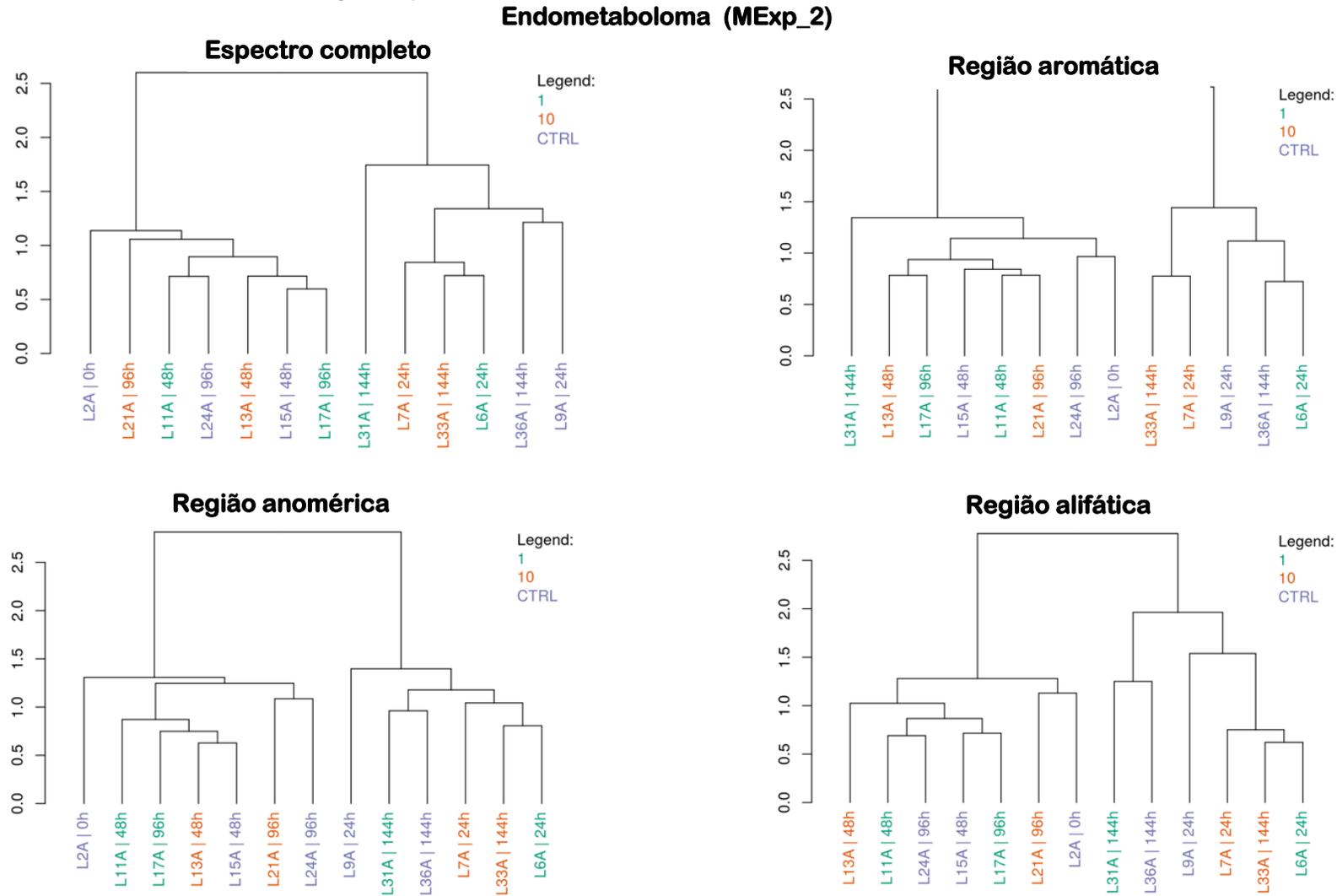
Ainda que alterações entre as amostras de diferentes tratamentos tenham sido verificadas no exometaboloma, quando o endometaboloma foi analisado utilizando as mesmas técnicas multivariadas, não foram observadas diferenças que indicassem efeito do EE2 no metabolismo da alga nem após 48 h no MExp_1, nem após 144 h no MExp_2, ambos ensaios consideraram concentrações muito acima do possivelmente encontrado no ambiente. As análises hierárquicas (Figura 37) realizadas para a totalidade dos sinais dos espectros e para as regiões aromática, anomérica e alifáticas apresentam padrões semelhantes de distribuição das amostras do endometaboloma do MExp_2. Em todas as regiões analisadas, há a formação de dois principais clusters, um com amostras de 24h e 144h e outro com amostras do intervalo de 48h e 96h de cultivo, independente da concentração do EE2 a que as algas foram expostas. A diferença entre os tempos pode ser confirmada pelos resultados da análise de variância ANOVA. Para os diferentes tempos amostrais (24h, 48h, 96h e 144h) este teste estatístico apontou 16 ressonâncias responsáveis pelos agrupamentos das amostras com valores de p inferior a 0,05 considerando o espectro completo, 13 para a região aromática, 24 para a região anomérica e 38 para a alifática (Quadro 4).

Quadro 4: Ressonâncias das diferentes regiões do espectro com $p < 0,05$ nos resultado da ANOVA para as amostras do endometaboloma (MExp_2) nos diferentes tempos amostrais (24h, 48h, 96h, 144h).

Espectro completo	Região aromática	Região anomérica	Região alifática
0,5; 0,71; 0,77; 1,01; 1,05; 1,25; 1,31; 1,45; 1,62; 1,79; 1,85; 1,9; 1,95; 1,98; 2,28; 2,4	5,99; 6,21; 6,24; 6,32; 6,36; 7,27; 8,75; 9,18; 9,41; 9,5; 9,63; 9,7	3,39; 3,48; 3,51; 3,54; 3,72; 3,75; 3,81; 3,87; 3,9; 3,93; 3,96; 3,99; 4,05; 4,13; 4,17; 4,21; 4,24; 4,28; 4,49; 4,53; 4,58; 5,3; 5,34; 5,37	0,5; 0,62; 0,71; 0,73; 0,77; 0,8; 0,84; 0,86; 0,9; 0,94; 0,97; 1,01; 1,05; 1,25; 1,29; 1,31; 1,35; 1,39; 1,45; 1,51; 1,56; 1,59; 1,62; 1,7; 1,76; 1,79; 1,81; 1,85; 1,9; 1,95; 1,98; 2,01; 2,07; 2,1; 2,28; 2,31; 2,34; 2,4

Fonte: Autor.

Figura 37: Análise hierárquica entre as amostras do endometaboloma (MExp_2) considerando o espectro completo e as regiões aromáticas, anoméricas e alifáticas. Fator discriminante representado pelas cores é a concentração de EE2 a que a alga *Ulva lactuca* foi expostas ao longo do tempo (24h, 48h, 96h, e 144h). verde = 1.000 ng/L; laranja = 10.000 ng/L e lilás = controle. A análise considerou como métrica de distância de pearson e as médias como método de aglomeração



Fonte: Autor.

Observando o Quadro 4, pode-se observar que na análise do espectro completo, a maioria das ressonâncias que influenciaram mais os agrupamentos observados, encontram-se na região alifática (δ de 0 a 3 ppm). Quando realizada a ANOVA em função das concentrações (controle, 1.000 e 10.000 ng/L) somente uma ressonância na região anomérica (4,08 ppm) foi diferente estatisticamente ($p < 0,05$) para as amostras do controle e as expostas a 10.000 ng/L (Tukey). Nas demais regiões nenhuma ressonância foi apontada como diferente estatisticamente entre os tratamentos de exposição ao EE2.

Ainda não existem dados sobre o efeito de EE2 disponíveis na literatura sobre o metaboloma de macroalgas para a comparação de resultados. Álvarez-Muñoz e colaboradores (2015) foram os únicos até então a investigarem a possibilidade de acumulação do hormônio EE2 em macroalgas. Os autores buscaram identificar o EE2 nas macroalgas *Laminaria digitata* e *Saccharina latissima*, coletadas no ambiente, mas o estrógeno não foi identificado nas algas. Cabe salientar que neste caso, EE2 também não foi identificado em bivalves ou peixes e a identificação na água do mar não foi realizada por estes autores.

Para microalgas (Tabela 4), a maioria dos estudos realizados buscaram quantificar a biotransformação ou a bioacumulação do estrógeno nas espécies estudadas. Dentre as espécies que apresentaram acumulação do estrógeno ou promoveram a redução de sua concentração de EE2 no meio de cultura por biotransformação estão as algas *Haematococcus pluvialis*, *Navicula salinicola*, *Scenedesmus quadricauda*, *Desmodesmus subspicatus*, *S. vacuolatus*, *Selenastrum capricornutum* e *Ankistrodesmus* (DELLA GRECA et al., 2008; LAI; SCRIMSHAW; LESTER, 2002a; LIU et al., 2010; MAES et al., 2014; WANG et al., 2019). No entanto, como observado neste estudo, algumas espécies como *Chlorella vulgaris*, *C. pyrenoidosa*, *C. ellipsoidea*, *Scenedesmus obliquus* e *S. communis* também não tiveram a biotransformação induzida ou o EE2 detectado dentro das células (DELLA GRECA et al., 2008; LAI; SCRIMSHAW; LESTER, 2002a; WANG et al., 2019) de forma que a internalização do hormônio varia bastante de espécie a espécie.

6.4 CONCLUSÃO

A abordagem analítica acoplada às ferramentas de bioinformática adotadas neste estudo parece ser adequada, quando se está interessado em investigar a presença de um

xenobiótico tanto no endo- como no exometaboloma de uma amostra complexa. Sem dúvida, ajustes para realizar a identificação automática dos metabólitos que referem-se às principais ressonâncias responsáveis pelos agrupamentos, ou para a exposição da(s) referência(s) bibliográfica(s) dos compostos identificados, acrescentariam automaticamente, informações interessantes à pesquisa que geralmente demandam tempo para serem adquiridas.

Em relação à identificação dos compostos, a utilização do *Specmine DataBase* integrado a outros repositórios como o HMDB ou MMCD, sem dúvida aumenta as chances de que metabólitos mais específicos ao modelo biológico, neste caso, a alga *Ulva lactuca*, sejam identificados. O banco de dados aqui apresentado não é simplesmente mais um banco de espectros destinado a algas, mas uma compilação de informações abrangentes sobre os organismos em que cada metabólito já foi identificado, que em conjunto ao algoritmo do *package specmine*, pode ser usado para ranquear os metabólitos de acordo com as probabilidades de ocorrência baseado na literatura sobre o organismo estudado e características dos espectros anotados. A utilização deste tipo de abordagem, visa diminuir o tempo de verificação manual dos espectros como parte do pós-processamento da identificação automática de metabólitos a partir de espectros $^1\text{H-RMN}$.

Finalmente, nossos achados sobre a elucidação estrutural do endo- e exometaboloma da *U. lactuca* destacam sobre quais classes de compostos a presença do EE2 parece estar afetando, e o que poderia ser melhor explorado em novos estudos de metaboloma. A biotransformação do EE2 pela alga não foi observada neste estudo, de forma que, a diminuição do hormônio ao longo do tempo deve estar relacionada à degradação natural do hormônio (i.e. luz e aeração).

7 CONCLUSÃO GERAL

Como apresentado no Capítulo 1, o estrógeno encontra-se em águas costeiras, em concentrações maiores às concentrações de não efeito (PNEC, 0,1 ng/L) proposta para peixes por Caldwell e colaboradores (2012). Dos pontos amostrados, o Rio Capivari que deságua em praia popular de Florianópolis (Ingleses) enquadra-se acima deste limite e o monitoramento e medidas para a redução deste composto na água são recomendados. Neste estudo, somente a fração conjugada do EE2 (mais solúvel e biologicamente inativa) foi considerada e estima-se que a concentração total do hormônio nas águas de Florianópolis sejam ainda maiores que as identificadas neste trabalho. Estudos que também considerem a fração livre desse composto são necessários.

Em relação à exposição de *Ulva lactuca* ao EE2, não há indícios de bioacumulação do hormônio no tecido da macroalga, nem quando coletada diretamente em ambiente onde o EE2 foi detectado na água (Sangradouro) e analisada por ELISA, nem em ensaios *in vitro* (48h) com concentrações de EE2 muito acima (0,001 a 1 mg/L) às encontradas no ambiente (> 0,04 a 0,12 ng/L) analisadas via técnicas de RMN. As alterações metabólicas observadas via ¹H-RMN da alga exposta ao EE2 e do seu meio de cultivo, não apresentaram alterações significativas no endometaboloma desta espécie, apesar de a análise hierárquica ter apontado uma tendência ao agrupamento dessas amostras. Já para o exometaboloma, além do agrupamento definido das amostras expostas, houveram também indícios da redução do EE2 no meio de cultivo ao longo do tempo. A biotransformação do EE2 pela alga não foi observada neste estudo e ambos resultados para o exometaboloma podem estar relacionados ao metabolismo de microrganismos no meio (cultura não axênica) e/ou às variáveis do próprio cultivo (i.e., luz e aeração), e não ao metaboloma da alga em si. Apesar dos resultados via ¹H-RMN não terem apresentado diferenças significativas e confirmatórias de alterações metabólicas na alga, análises via UHPLC das mesmas amostras exibiram como resultado alterações na concentração de carotenoides e clorofila entre os grupos de amostras tratadas com EE2 e controle.

Este é o primeiro trabalho que aponta alterações de qualquer natureza em macroalgas expostas ao EE2, no entanto, sugere-se a realização de estudos investigativos sobre a possibilidade de alteração na composição e concentração de ácidos graxos, a peroxidação lipídica, bem como outras respostas antioxidantes (ex. glutatona redutase e malondialdeído) antes de considerar a alga como um bom bioindicador, uma vez que outros organismos, como

peixes e moluscos (ARIS et al. 2014), apresentam alterações bem caracterizadas à presença deste xenobiótico, nas concentrações encontradas neste estudo (Anexo B).

Por fim, o trabalho apresenta ainda uma contribuição promissora à análise bioinformática para a identificação de compostos em matrizes brutas ao combinar ao *package specmine*, a compilação de um banco de metabólitos para a algas, o *Specmine AlgaeDatabase*. O banco de dados poderá ser dinamicamente alimentado com novos compostos e outros modelos biológicos, otimizando a identificação automatizada de metabólitos de organismos alvo a partir de dados espectrais ^1H -RMN.

REFERÊNCIAS

ABD EL-BAKY, H. H.; EL BAZ, F. K.; BAROTY, G. S. Evaluation of Marine Alga *Ulva lactuca* L. as A Source of Natural Preservative Ingredient. **American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci**, v. 3, n. 3, p. 434–444, 2008.

ABDEL-AAL, E.-S. M.; RABALSKI, I. Composition of Lutein Ester Regioisomers in Marigold Flower, Dietary Supplement, and Herbal Tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 44, p. 9740–9746, 11 nov. 2015.

ABRAHAM, R. J. et al. ¹H chemical shifts in NMR: Part 23, the effect of dimethyl sulphoxide versus chloroform solvent on ¹H chemical shifts. **Magnetic Resonance Chemistry**, v. 44, p. 491–509, 2006.

ADEEL, M. et al. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. **Environment International journal**, v. 99, p. 107–119, 2017.

AGÊNCIA DE REGULAÇÃO DE SERVIÇOS PÚBLICOS DE SANTA CATARINA (ARESC). **Programa de Monitoramento do Rio do Brás Município de Florianópolis / SC** Agência de Regulação de Serviços Públicos de Santa Catarina (ARESC). Florianópolis: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.aresc.sc.gov.br/index.php/documentos/relatorios-de-fiscalizacao-de-municipios-conveniados/municipios-agua/florianopolis/1150-aresc-gefis-020-17-rp4-programa-de-monitoramento-do-rio-do-bras-versao-final-aresc/file>>. Acesso em: 17 jun. 2019.

ALAHVERDI, M.; SAVABIEASFAHANI, M. Seaweed and Chlorophyll as Biomarkers of Metals in the Persian Gulf, Iran. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 89, p. 501–506, 6 set. 2012.

ALAN F. BLUMBERG; RICHARD P. SIGNELL; HARRY L. JENTER. Modeling Transport Processes in the Coastal Ocean. In: NATIONAL RESEARCH COUNCIL (Ed.). **Environmental Science in the Coastal Zone: Issues for Further Research**. Washington, D.C.: National Academies Press, 1994. p. 20–43.

ALLINSON, M. et al. In vitro and immunological assessment of the estrogenic activity and concentrations of 17 β -estradiol, estrone, and ethinyl estradiol in treated effluent from 45 wastewater treatment plants in victoria, Australia. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, p. 576–586, 2010.

ALSUFYANI, T. et al. Time Course Exo-Metabolomic Profiling in the Green Marine Macroalga *Ulva* (Chlorophyta) for Identification of Growth Phase-Dependent Biomarkers. **Marine Drugs**, v. 15, p. 14, 10 jan. 2017.

ÁLVAREZ-MUÑOZ, D. et al. Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in macroalgae, bivalves, and fish from coastal areas in Europe. **Environmental Research**, v. 143, p. 56–64, 2015.

ARÉVALO, R.; PINEDO, S.; BALLESTEROS, E. Changes in the composition and structure of Mediterranean rocky-shore communities following a gradient of nutrient enrichment: descriptive study and test of proposed methods to assess water quality regarding macroalgae. **Marine pollution bulletin**, v. 55, n. 1–6, p. 104–13, jan. 2007.

ARIS, A. Z.; SHAMSUDDIN, A. S.; PRAVEENA, S. M. Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. **Environment International**, v. 69, p. 104–119, 2014.

ATKINSON, S.; ATKINSON, M. J.; TARRANT, A. M. Estrogens from sewage in coastal marine environments. **Environmental health perspectives**, v. 111, n. 4, p. 531–535, abr. 2003.

ATKINSON, S. K. et al. Environmental Factors Affecting Ultraviolet Photodegradation Rates and Estrogenicity of Estrone and Ethinylestradiol in Natural Waters. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, n. 1, p. 1–7, 21 jan. 2011.

AURIOL, M. et al. Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 525–539, mar. 2006.

AWAD, N. E. Biologically active steroid from the green alga *Ulva lactuca*. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 641–643, 1 dez. 2000.

BALINA, K. et al. Impact of synthetic hormone 17 α -ethinylestradiol on growth of microalgae *Desmodesmus communis*. **Agronomy Research**, v. 13, n. 2, p. 445–454, 2015.

BARREIROS, L. et al. Analysis of 17- β -estradiol and 17- α -ethinylestradiol in biological and environmental matrices — A review. **Microchemical Journal**, v. 126, p. 243–262, 2016.

BECK, I.-C. et al. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea. **Journal of Chromatography A**, v. 1090, n. 1–2, p. 98–106, out. 2005.

BELHAJ, D. et al. Biochemical and physiological responses of halophilic nanophytoplankton (*Dunaliella salina*) from exposure to xeno-estrogen 17 α -ethinylestradiol. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 7392–7402, 2017.

BERG, R. A. VAN DEN et al. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. **BMC Genomics**, v. 7, p. 142, 2006.

BERGAMASCO, A. M. D. D. et al. Bioluminescent yeast estrogen assay (BLYES) as a sensitive tool to monitor surface and drinking water for estrogenicity. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, n. 11, p. 3288–3293, 2011.

BERTIN, A.; INOSTROZA, P. A.; QUIÑONES, R. A. A theoretical estimation of the concentration of steroid estrogens in effluents released from municipal sewage treatment plants into aquatic ecosystems of central-southern Chile. **The Science of the total environment**, v. 407, n. 17, p. 4965–4971, 15 ago. 2009.

BEYER, T.; SCHOLLMAYER, C.; HOLZGRABE, U. The role of solvents in the signal separation for quantitative ¹H NMR spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, p. 51–58, 2010.

BHANDARI, R. et al. Photosynthetic pigments and fatty acid composition of four marine green algae from the coastal zones of Goa. **Indian Hydrobiology**, v. 14, n. 2, p. 181–191, 2012.

BHARTI, S. K.; ROY, R. Quantitative ¹H NMR spectroscopy. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 5–26, 2012.

BISCHOF, K. et al. Solar ultraviolet radiation affects the activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase and the composition of photosynthetic and xanthophyll cycle pigments in the intertidal green alga *Ulva lactuca* L. **Planta**, v. 215, n. 3, p. 502–509, 2002.

BOSCH OJEDA, C.; SANCHEZ ROJAS, F.; CANO PAVON, J. Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry. **Talanta**, v. 42, p. 1195–1214, 1995.

BOUBONARI, T.; MALEA, P.; KEVREKIDIS, T. The green seaweed *Ulva rigida* as a bioindicator of metals (Zn, Cu, Pb and Cd) in a low-salinity coastal environment. **Botanica Marina**, v. 51, p. 472–484, 2008.

BREITHAUPT, D. E.; WIRT, U.; BAMEDI, A. Differentiation between lutein monoester regioisomers and detection of lutein diesters from marigold flowers (*Tagetes erecta*

L.) and Several fruits by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 66–70, 2002.

BUNEA, A.; SOCACIU, C.; PINTEA, A. Xanthophyll esters in fruits and vegetables. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 42, n. 2, p. 310–324, 2014.

CALDWELL, D. J. et al. Derivation of an Aquatic Predicted No-Effect Concentration for the Synthetic Hormone, 17 α -Ethinyl Estradiol. **Environmental Science & Technology**, v. 42, p. 7046–7054, out. 2008.

CALDWELL, D. J. et al. Predicted-no-effect concentrations for the steroid estrogens estrone, 17 β -estradiol, estriol, and 17 α -ethinylestradiol. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 6, p. 1396–1406, 2012.

CHAKRABORTY, S. et al. Benthic macroalgae as biological indicators of heavy metal pollution in the marine environments: A biomonitoring approach for pollution assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 100, p. 61–68, 2014.

CHAUDHURI, A. et al. Heavy metal biomonitoring by seaweeds on the Delmarva Peninsula, east coast of the USA. **Botanica Marina**, v. 50, p. 151–158, 2007.

CHÁVEZ-SÁNCHEZ, T. et al. Ulva blooms in the southwestern Gulf of California: Reproduction and biomass. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 200, p. 202–211, 2018.

COELHO, S. M. et al. How to cultivate Ectocarpus. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2012, n. 2, p. 258–261, 1 fev. 2012.

COLBORN, T. The Wildlife/Human Connection: Modernizing Risk Decisions. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, n. 12, p. 55–59, 1994.

COMBALBERT, S.; HERNANDEZ-RAQUET, G. Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 1671–1692, 2010.

COMPANHIA CATARINENSE DE ÁGUAS E SANEAMENTO (CASAN). **Fiscalização revela que irregularidades nas ligações de esgoto chegam a 80%**. set. 2014. Disponível em: <<https://www.casan.com.br/noticia/index/url/fiscalizacao-revela-que-irregularidades-nas-ligacoes-de-esgoto-chegam-a-80#0>>. Acesso em: 11 nov. 2019a.

COMPANHIA CATARINENSE DE ÁGUAS E SANEAMENTO (CASAN). **Floripa Se Liga na Rede prossegue vitorias nos sistemas de esgoto**. abr. 2014. Disponível em: <<https://www.casan.com.br/noticia/index/url/floripa-se-liga-na-rede-prossegue-vitorias-nos-sistemas-de-esgoto#0>>. Acesso em: 11 nov. 2019b.

COMPANHIA CATARINENSE DE ÁGUAS E SANEAMENTO (CASAN). **Análises laboratoriais mostram evolução da qualidade da água do Rio do Braz**. jan. 2018. Disponível em: <<https://www.casan.com.br/noticia/index/url/analises-laboratoriais-mostram-evolucao-da-qualidade-da-agua-do-rio-do-braz#0>>. Acesso em: 11 nov. 2019.

COMPANHIA CATARINENSE DE ÁGUAS E SANEAMENTO (CASAN). **CASAN seleciona empresa para ampliação do Sistema de Esgoto Insular de Florianópolis**. mai. 2018. Disponível em: <<https://www.casan.com.br/noticia/index/url/casan-seleciona-empresa-para-ampliacao-do-sistema-de-esgoto-insular-de-florianopolis#0>>. Acesso em: 11 nov. 2019.

CORDEIRO, D. et al. HPLC determination of hormones in so Jos do rio Preto municipal dam, São Paulo, Brazil. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 35, n. 19, p. 2685–2695, 2012.

COSTA, C.; MARASCHIN, M.; ROCHA, M. An R package for the integrated analysis of metabolomics and spectral data. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 129, n. 2, p. 117–124, 2016.

COSTA, C.; MARASCHIN, M.; ROCHA, M. **Specmine: Metabolomics and Spectral Data Analysis and Mining** -, 2017. Disponível em: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/54949/1/document_47752_1.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2019

CRAWLEY, M. J. **The R book**. Second Edi ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. v. 45

CUBBERLEY, M. S.; IVERSON, B. L. ¹H NMR investigation of solvent effects in aromatic stacking interactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 31, p. 7560–7563, 2001.

CUNHA, D. L. DA et al. Regulation of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol in water bodies in Europe, the United States, and Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 3, p. e00056715, 2016.

DALAGO SALGADO, L. et al. Integrated assessment of sediment contaminant levels and biological responses in sentinel fish species *Atherinella brasiliensis* from a sub-tropical estuary in south Atlantic. **Chemosphere**, v. 219, p. 15–27, 2019.

DAMSTRA, T. et al. **Sumario: GLOBAL ASSESSMENT OF THE STATE-OF-THE-SCIENCE OF ENDOCRINE DISRUPTORS**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.who.int/ipcs/publications/en/toc.pdf?ua=1>>. Acesso em: 22 mar. 2018.

DAVIS, G. D. J.; VASANTHI, A. H. R. Seaweed metabolite database (SWMD): A database of natural compounds from marine algae. **Bioinformation**, v. 5, n. 8, p. 361–364, 2011.

DE MES, T.; ZEEMAN, G.; LETTINGA, G. Occurrence and fate of estrone, 17 β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol in STPs for domestic wastewater. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, n. 4, p. 275–311, 2005.

DELLA GRECA, M. et al. Biotransformation of ethinylestradiol by microalgae. **Chemosphere**, v. 70, n. 11, p. 2047–2053, 2008.

DHONT, M. History of oral contraception. **The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care**, v. 15, n. sup2, p. 2–12, 2010.

DIAS, A. C. V. et al. Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p. 41–47, 2015.

DIAS, T. M. et al. The opportunity pill: discourses about the birth control pill in A Gazeta da Farmácia, 1960-1981. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 25, n. 3, p. 725–742, set. 2018.

DO NASCIMENTO, M. T. L. et al. Determination of water quality, toxicity and estrogenic activity in a nearshore marine environment in Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 149, p. 197–202, 2018.

DORDICK, J. S. Designing enzymes for use in organic solvents. **Biotechnology Progress**, v. 8, p. 259–267, jul. 1992.

EGHBALNIA, H. R. et al. Increasing rigor in NMR-based metabolomics through validated and open source tools. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 43, p. 56–61, fev. 2017.

EL JAY, A. Effects of Organic Solvents and Solvent-Atrazine Interactions on Two Algae, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 31, p. 84–90, 1996.

ELLINGER, J. J. et al. Databases and Software for NMR-Based Metabolomics. **Current Metabolomics**, v. 1, n. 1, p. 22p, 2013.

EMWAS, A. et al. Recommended strategies for spectral processing and post-processing of 1D ¹H-NMR data of biofluids with a particular focus on urine. **Metabolomics**, v. 14, n. 31, p. 1–23, 2018.

EPA, E. P. A. **Endocrine Disruptor Screening Program** Federal Register United States Federal Register / Notices, , 1998. Disponível em: <<https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-1998-08-11/pdf/98-21522.pdf>>. Acesso em: 21 mar. 2018

FAUZAN, T. et al. Endocrine disrupting compounds (EDCs) in environmental matrices: Review of analytical strategies for pharmaceuticals, estrogenic hormones, and alkylphenol compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 85, p. 241–259, 2016.

FAZELI, M. R. et al. Nicotine inhibition of lycopene cyclase enhances accumulation of carotenoid intermediates by *Dunaliella salina* CCAP 19/18. **European Journal of Phycology**, v. 44, n. 2, p. 215–220, 2009.

FERGUSON, E. M. et al. Fluctuations in natural and synthetic estrogen concentrations in a tidal estuary in south-eastern Australia. **Water Research**, v. 47, p. 1604–1615, 2013.

FERREIRA, N. C. **Comunidade de peixes da Lagoa do Peri e seu Canal Sangradouro, Florianópolis, SC**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

FIEHN, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. **Comparative and Functional Genomics**, v. 2, p. 155–168, 2001.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES SOBRE SANEAMENTO. Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – 2017. Brasília: SNS/MDR, 2019. Disponível em: <http://www.snis.gov.br/diagnostico-agua-e-esgotos/diagnostico-ae-2017> >. Acesso em: 01 de novembro de 2019.

FLODIN, C.; WHITFIELD, F. B. 4-hydroxybenzoic acid: A likely precursor of 2,4,6-tribromophenol in *Ulva lactuca*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 2, p. 249–255, 1 maio 1999.

FLORIANÓPOLIS. **Floripa Se Liga na Rede - Fiscalização contra ligação clandestina no Norte da Ilha multa 9 imóveis**. Disponível em: <<http://www.pmf.sc.gov.br/entidades/seliganarede/index.php?pagina=notpagina&menu=¬i=20438>>. Acesso em: 11 nov. 2019a.

FLORIANÓPOLIS. **Floripa Se Liga na Rede - Prefeitura efetua lacres e multa moradores por lançamento irregular de esgoto nos Ingleses**. Disponível em:

<<http://www.pmf.sc.gov.br/entidades/seliganarede/index.php?pagina=notpagina&menu=¬i=20614>>. Acesso em: 11 nov. 2019b.

FOLMAR, L. . et al. Comparative estrogenicity of estradiol, ethynyl estradiol and diethylstilbestrol in an in vivo, male sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*), vitellogenin bioassay. **Aquatic Toxicology**, v. 49, n. 1–2, p. 77–88, maio 2000.

FONG, P. et al. Salinity stress, nitrogen competition, and facilitation: What controls seasonal succession of two opportunistic green macroalgae? **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 206, p. 203–221, 1996.

FONSECA, A.; BRAGA, E. S.; EICHLER, B. B. Distribuição Espacial Dos Nutrientes Inorgânicos Dissolvidos E Da Biomassa Fitoplanctônica No Sistema Pelágico Da Lagoa Da Conceição , Santa Catarina , Brasil . (Setembro , 2000). **Atlântica, Rio Grande**, v. 24, n. 2, p. 69–83, 2002.

FRANKLIN, L. A. et al. Two components of onset and recovery during photoinhibition of *Ulva rotundata*. **Planta**, v. 186, p. 399–408, 1992.

FRANKLIN, L. A. The effects of temperature acclimation on the photoinhibitory responses of *Ulva rotundata* Blid. **Planta**, v. 192, p. 324–331, 1994.

FROEHNER, S. et al. Occurrence of selected estrogens in mangrove sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, p. 75–79, 2012.

GABET-GIRAUD, V. et al. Occurrence and removal of estrogens and beta blockers by various processes in wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment, The**, v. 408, p. 4257–4269, 2010.

GAO, G. et al. Intrinsic and extrinsic control of reproduction in the green tide-forming alga, *Ulva rigida*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 139, p. 14–22, jul. 2017.

GE, L. et al. Microalgae-promoted photodegradation of two endocrine disrupters in aqueous solutions. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, n. 3, p. 331–336, mar. 2009.

GENTILI, A. et al. Analysis of free estrogens and their conjugates in sewage and river waters by solid-phase extraction then liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Chromatographia**, v. 56, n. 1–2, p. 25–32, 2002.

GIMILIANI, G. T.; FONTES, R. F. C.; ABESSA, D. M. DE S. Modeling the dispersion of endocrine disruptors in the Santos Estuarine System (Sao Paulo State, Brazil). **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 64, n. 1, p. 1–8, 2016.

GOMES, P. D. et al. Contracepção hormonal: uma comparação entre pacientes das redes pública e privada de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 5, p. 2453–2460, maio 2011.

GOTTLIEB, H. E. .; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 62, p. 7512–7515, 1997.

GUPTA, M. N. et al. Polarity Index: The Guiding Solvent Parameter for Enzyme Stability in Aqueous-Organic Cosolvent Mixtures. **Biotechnology Progress**, v. 13, p. 284–288, 5 jun. 1997.

GUPTA, V. et al. Central metabolic processes of marine macrophytic algae revealed from NMR based metabolome analysis. **The Royal Society of Chemistry Advances**, v. 3, p. 7037–7047, 2013.

HALABALAKI, M. et al. Recent advances and new strategies in the NMR-based identification of natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 25, p. 1–7, 2014.

HAMID, H.; ESKICIOGLU, C. Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. **Water Research**, v. 46, n. 18, p. 5813–5833, 15 nov. 2012.

HAN, T. et al. Spore release by the green alga *Ulva*: A quantitative assay to evaluate aquatic toxicants. **Environmental Pollution**, v. 153, p. 699–705, 2008.

HAN, T.; CHOI, G.-W. A novel marine algal toxicity bioassay based on sporulation inhibition in the green macroalga *Ulva pertusa* (Chlorophyta). **Aquatic Toxicology**, v. 75, p. 202–212, 2005.

HANSEN, S. F.; TICKNER, J. A. The precautionary principle and false alarms — lessons learned. In: GEE, D. et al. (Eds.). . **Late Lessons From Early Warnings: Science, Precaution, Innovation**. EEA ed. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2013. p. 17–45.

HAO, J. et al. Batman-an R package for the automated quantification of metabolites from nuclear magnetic resonance spectra using a bayesian model. **Bioinformatics**, v. 28, n. 15, p. 2088–2090, 2012.

HAY, M. E. Marine chemical ecology: what's known and what's next? **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 200, n. 1–2, p. 103–134, nov. 1996.

HENNEMANN, M. C.; PETRUCIO, M. M. Spatial and temporal dynamic of trophic relevant parameters in a subtropical coastal lagoon in Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 181, p. 347–361, 2011.

HENRIQUES, B. et al. A macroalgae-based biotechnology for water remediation: Simultaneous removal of Cd, Pb and Hg by living *Ulva lactuca*. **Journal of Environmental Management**, v. 191, p. 275–289, 2017.

HOM-DIAZ, A. et al. Microalgae cultivation on wastewater digestate: β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol degradation and transformation products identification. **Journal of Environmental Management**, v. 155, p. 106–113, maio 2015.

IDE, A. H. et al. Occurrence of Pharmaceutical Products, Female Sex Hormones and Caffeine in a Subtropical Region in Brazil. **CLEAN - Soil, Air, Water**, v. 45, n. 9, p. 1700334, 1 set. 2017.

INSTITUTO DO MEIO AMBIENTE DE SANTA CATARINA (IMA). **Balneabilidade do litoral catarinense - 2019**. Disponível em: <<https://balneabilidade.ima.sc.gov.br/relatorio/historico>>. Acesso em: 11 nov. 2019.

JACOB, D.; DEBORDE, C.; MOING, A. An efficient spectra processing method for metabolite identification from 1 H-NMR metabolomics data. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 5049–5061, 2013.

JARDIM, W. F. et al. An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water. **Separation and Purification Technology**, v. 84, p. 3–8, 2012.

JOBLING, S.; OWEN, R. Ethinyl oestradiol in the aquatic environment. In: GEE, D. et al. (Eds.). **Late lessons from early warnings: science, precaution, innovation**. EEA ed. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2013. p. 311–339.

JOHNSON, A. C.; WILLIAMS, R. J. A model to estimate influent and effluent concentrations of estradiol, estrone, and ethinylestradiol at sewage treatment works. **Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 13, p. 3649–3658, 2004.

JOHNSON, S. R.; LANGE, B. M. Open-Access Metabolomics Databases for Natural Product Research: Present Capabilities and Future Potential. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, p. 22, 4 mar. 2015.

JUBERG, D. R. Review with conclusions: An Evaluation of Endocrine Modulators: Implications for Human Health. **Ecotoxicology and Environmental Safety, Environmental Research, Section B**, v. 45, p. 93–105, 2000.

JÜRGENS, M. D. J. et al. The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in english rivers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 480–488, 2002.

KAKINUMA, M.; KUNO, Y.; AMANO, H. Salinity stress responses of a sterile mutant of *Ulva pertusa* (Ulvales, Chlorophyta). **FISHERIES SCIENCE Blackwell Science**, v. 70, p. 1177–1179, 2004.

KAPETANOVIĆ, R. et al. Sterol composition of the Adriatic Sea algae *Ulva lactuca*, *Codium dichotomum*, *Cystoseira adriatica* and *Fucus virsoides*. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 70, n. 12, p. 1395–1400, 2005.

KAUNITZ, A. M. Oral contraceptive health benefits: Perception versus reality. **Contraception**, v. 59, p. 29S-33S, 1999.

KIDD, K. A. et al. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 21, p. 8897–8901, 2007.

KIDD, K. A. et al. Direct and indirect responses of a freshwater food web to a potent synthetic oestrogen. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 369, n. 1656, p. 20130578, 19 nov. 2014.

KIRKENDALE, L.; SAUNDERS, G. W.; WINBERG, P. C. A molecular survey of *Ulva* (Chlorophyta) in temperate Australia reveals enhanced levels of cosmopolitanism. **European Journal of Phycology**, v. 49, n. 1, p. 69–81, 2013.

KOH, Y. K. K. et al. Treatment and removal strategies for estrogens from wastewater. **Environmental Technology**, v. 29, p. 245–267, 2008.

KUCH, H. M.; BALLSCHMITER, K. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCD)-MS in the picogram per liter range. **Environmental Science and Technology**, v. 35, p. 3201–3206, 2001.

KUHLISCH, C.; POHNERT, G. Metabolomics in chemical ecology. **Nat. Prod. Rep.**, v. 32, n. 7, p. 937–955, 2015.

KUMAR, M. et al. Differential responses to cadmium induced oxidative stress in marine macroalga *Ulva lactuca* (Ulvales, Chlorophyta). **BioMetals**, v. 23, p. 315–325, 2010.

KUSTER, M. et al. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). **Environment International**, v. 35, p. 997–1003, 2009.

LAI, K. M. et al. Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems. **Environmental Science and Technology**, v. 34, n. 18, p. 3890–3894, 2000.

LAI, K. M.; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J. N. Biotransformation and Bioconcentration of Steroid Estrogens by *Chlorella vulgaris*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 859–864, 1 fev. 2002a.

LAI, K. M.; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J. N. Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems. **The Science of the total environment**, v. 289, n. 1–3, p. 159–168, 22 abr. 2002b.

LANGE, I. G. et al. Sex hormones originating from different livestock production systems: fate and potential disrupting activity in the environment. **Analytica Chimica Acta**, v. 473, p. 27–37, 2002.

LANKADURAI, B. P.; NAGATO, E. G.; SIMPSON, M. J. Environmental metabolomics: an emerging approach to study organism responses to environmental stressors. **Environmental Reviews**, v. 21, n. 3, p. 180–205, set. 2013.

LAURENSEN, J. P. et al. Ethinyl estradiol and other human pharmaceutical estrogens in the aquatic environment: a review of recent risk assessment data. **The AAPS journal**, v. 16, n. 2, p. 299–310, mar. 2014.

LEWIS, I. A. et al. Metabolite identification via the Madison Metabolomics Consortium Database. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 162–164, 2008.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement And Characterization by UV-VIS Spectroscopy. In: **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

LIN, J.-H.; LEE, D.-J.; CHANG, J.-S. Lutein in specific marigold flowers and microalgae. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 49, p. 90–94, 2015.

LIU, B.; WU, F.; DENG, N. UV-light induced photodegradation of 17 α -ethynylestradiol in aqueous solutions. **Journal of Hazardous Materials**, v. B98, p. 311–316, 2003.

LIU, Y. et al. Cellular responses, biodegradation and bioaccumulation of endocrine disrupting chemicals in marine diatom *Navicula incerta*. **Chemosphere**, v. 80, n. 5, p. 592–599, jul. 2010.

LIU, Z. HUA et al. Occurrence, fate and removal of synthetic oral contraceptives (SOCs) in the natural environment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 5149–5161, 2011.

LÓPEZ-DOVAL, J. C. et al. Nutrients, emerging pollutants and pesticides in a tropical urban reservoir: Spatial distributions and risk assessment. **Science of the Total Environment**, v. 575, p. 1307–1324, 2017.

LOURENÇO, A. et al. @Note: A workbench for Biomedical Text Mining. **Journal of Biomedical Informatics**, v. 42, n. 4, p. 710–720, 1 ago. 2009.

LUDWIG, C. et al. Birmingham Metabolite Library: A publicly accessible database of 1-D 1H and 2-D 1H J-resolved NMR spectra of authentic metabolite standards (BML-NMR). **Metabolomics**, v. 8, p. 8–18, 2012.

MACHADO, K. C. et al. A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 572, p. 138–146, 2016.

MACHADO, K. S. et al. Occurrence of female sexual hormones in the Iguazu river basin, Curitiba, Paraná State, Brazil. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 36, n. 3, p. 421, 26 fev. 2014.

MAES, H. M. et al. Uptake, Elimination, and Biotransformation of 17 α -Ethinylestradiol by the Freshwater Alga *Desmodesmus subspicatus*. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 20, p. 12354–12361, 21 out. 2014.

MANICKUM, T.; JOHN, W. The current preference for the immuno-analytical ELISA method for quantitation of steroid hormones (endocrine disruptor compounds) in wastewater in South Africa. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 4949–4970, 2015.

MARANHO, L. A. et al. Bioavailability, oxidative stress, neurotoxicity and genotoxicity of pharmaceuticals bound to marine sediments. The use of the polychaete *Hediste diversicolor* as bioindicator species. **Environmental Research**, v. 134, p. 353–365, 2014.

MARANHO, L. A. et al. A Candidate Short-Term Toxicity Test Using *Ampelisca brevicornis* to Assess Sublethal Responses to Pharmaceuticals Bound to Marine Sediments. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 68, p. 237–258, 2015a.

MARANHO, L. A. et al. Toxicological evaluation of sediment samples spiked with human pharmaceutical products: Energy status and neuroendocrine effects in marine polychaetes *Hediste diversicolor*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 118, p. 27–36, 2015b.

MARASCHIN, M. et al. A Machine Learning and Chemometrics Assisted Interpretation of Spectroscopic Data – A NMR-Based Metabolomics Platform for the Assessment of Brazilian Propolis. In: [s.l.] Springer, Berlin, Heidelberg, 2012. p. 129–140.

MARASCHIN, M. et al. Metabolic Profiling and Classification of Propolis Samples from Southern Brazil: An NMR-Based Platform Coupled with Machine Learning. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 1, p. 13–23, 22 jan. 2016.

MARINHA DO BRASIL. Centro de Hidrografia da Marinha. **Tábuas das Marés**. Disponível em: <<https://www.marinha.mil.br/chm/dados-do-segnav-publicacoes/tabuas-das-mares>>. Acesso em: 11 nov. 2019.

MASCHEK, J. A.; BAKER, B. J. The Chemistry of Algal Secondary Metabolism. In: **Algal Chemical Ecology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. p. 1–24.

MAYNARD, I. F. N. et al. Assessing the presence of endocrine disruptors and markers of anthropogenic activity in a water supply system in northeastern Brazil. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, p. 1–8, 30 abr. 2019.

MELLADO-ORTEGA, E.; HORNERO-MÉNDEZ, D. Isolation and identification of lutein esters, including their regioisomers, in tritordeum (\times Tritordeum Ascherson et Graebner) grains: Evidence for a preferential xanthophyll acyltransferase activity. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1344–1352, 2012.

MELO, S. M.; BRITO, N. M. Analysis and occurrence of endocrine disruptors in Brazilian water by HPLC-fluorescence detection. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 225, p. 1783 (1–7), 2014.

MESSYASZ, B.; RYBAK, A. Abiotic factors affecting the development of *Ulva* sp. (Ulvophyceae; Chlorophyta) in freshwater ecosystems. **Aquatic Ecology**, v. 45, n. 1, p. 75–87, 2011.

MOCO, S. et al. Metabolomics technologies and metabolite identification. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 9, p. 855–866, 2007.

MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. Spatial and Seasonal Variations of Pharmaceuticals and Endocrine Disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil). **Article J. Braz. Chem. Soc**, v. 22, n. 8, p. 1452–1462, 2011.

MOREIRA, D. S. et al. Occurrence of endocrine disrupting compounds in water sources of Belo Horizonte Metropolitan Area, Brazil. **Environmental Technology**, v. 30, n. 10, p. 1041–1049, set. 2009.

MOREIRA, M. et al. Determination of endocrine-disrupting compounds in waters from Rio das Velhas, Brazil, by liquid chromatography/high resolution mass spectrometry (ESI-LC-IT-TOF/MS). **Environmental Technology**, v. 32, n. 12, p. 1409–1417, 2011.

MORESCO, R. et al. UV-visible scanning spectrophotometry and chemometric analysis as tools for carotenoids analysis in cassava genotypes (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of Integrative Bioinformatics**, v. 12280, n. 124, 2015a.

MORESCO, R. et al. **Carotenoid Analysis of Cassava Genotypes Roots (*Manihot Esculenta* Crantz) Cultivated in Southern Brazil Using Chemometric Tools**. 9th Intern ed. [s.l.] Springer, Cham, 2015b. v. 375

NSC TOTAL. **Moradores protestam contra poluição da bacia do rio Ratonés, no Norte da Ilha**. Disponível em: <<https://www.nsctotal.com.br/noticias/moradores-protestam-contra-poluicao-da-bacia-do-rio-ratonés-no-norte-da-ilha>>. Acesso em: 11 nov. 2019.

NSC TOTAL. **Lixo na praia e poluição de rios e mares: os desafios de Florianópolis para a temporada**. Disponível em: <<https://www.nsctotal.com.br/noticias/lixo-na-praia-e-poluicao-de-rios-e-mares-os-desafios-de-florianopolis-para-a-temporada>>. Acesso em: 11 nov. 2019.

PAL, A. et al. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 6062–6069, 2010.

PAPE, C.; LUNING, K. Quantification of melatonin in phototrophic organisms. **Journal of Pineal Research**, v. 41, n. 2, p. 157–165, set. 2006.

PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 13, p. 263–269, 2012.

PEREIRA, C. D. S. et al. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. **Science of the Total Environment**, v. 548–549, p. 148–154, 2016.

PEREZ, C.; SIMÕES, F. R.; CODOGNOTO, L. Voltammetric determination of 17 α -ethinylestradiol hormone in supply dam using BDD electrode. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 20, p. 2471–2478, 2016.

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

PETRIDIS, P.; JHA, A. N.; LANGSTON, W. J. Measurements of the genotoxic potential of (xeno-)oestrogens in the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*, using the Comet assay. **Aquatic Toxicology**, v. 94, p. 8–15, 2009.

PETSAS, A. S.; VAGI, M. C. Effects on the Photosynthetic Activity of Algae after Exposure to Various Organic and Inorganic Pollutants: Review. In: **Chlorophyll**. [s.l.] InTech, 2017.

PILATTI, F. K. et al. In vitro exposure of *Ulva lactuca* Linnaeus (Chlorophyta) to gasoline – Biochemical and morphological alterations. **Chemosphere**, v. 156, p. 428–437, 2016.

POCOCK, T.; FALK, S. Negative impact on growth and photosynthesis in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in the presence of the estrogen 17 α -ethynylestradiol. **PLoS one**, v. 9, n. 10, p. e109289, 13 jan. 2014.

POPOV, S. S. et al. Sterols from some black sea ulvaceae. **Phytochemistry**, v. 24, n. 9, p. 1987–1990, 1985.

PUSCEDDU, F. H. et al. Estrogen levels in surface sediments from a multi-impacted Brazilian estuarine system. **Marine Pollution Bulletin**, v. 142, p. 576–580, 2019.

RAHMAN KABIR, E.; RAHMAN, M. S.; RAHMAN, I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, p. 241–258, 2015.

RAMLOV, F. et al. Metabolic and cellular alterations induced by diesel oil in *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 4, p. 1879–1888, 28 nov. 2013.

REN, D. et al. Effects of pH and dissolved oxygen on the photodegradation of 17 α -ethynylestradiol in dissolved humic acid solution. **Environmental Sciences: Processes and Impacts**, v. 18, p. 78–86, 2016.

RIBEIRO, C. et al. Seasonal and spatial distribution of several endocrine-disrupting compounds in the Douro River estuary, Portugal. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 56, p. 1–11, 2009.

RIVERA, S. M.; CANELA-GARAYOA, R. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. **Journal of Chromatography A**, v. 1224, p. 1–10, 2011.

ROBINETTE, S. L. et al. Web server based complex mixture analysis by NMR. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 10, p. 3606–3611, 2008.

ROCHA, M. J. et al. Endocrine disruptors in the Leça River and nearby Porto Coast (NW Portugal): Presence of estrogenic compounds and hypoxic conditions. **Toxicological and Environmental Chemistry**, v. 94, n. 2, p. 262–274, 2012.

SANDERSON, H. et al. Toxicity classification and evaluation of four pharmaceuticals classes: antibiotics, antineoplastics, cardiovascular, and sex hormones. **Toxicology**, v. 203, p. 27–40, 2004.

SANTIAGO, A. G. et al. Diferentes níveis de percepção da paisagem da lagoa da conceição (SC) através do SIG. **Paisagem e Ambiente**, n. 14, p. 171, 2001.

SANTOS, G. F. DOS et al. Análise ambiental da Lagoa do Peri. **Geosul**, v. 4, p. 101–123, 1989.

SCHMITT, T. M.; HAY, M. E.; LINDQUIST, N. Constraints on Chemically Mediated Coevolution: Multiple Functions for Seaweed Secondary Metabolites. **Ecology**, v. 76, n. 1, p. 107–123, jan. 1995.

SCHUG, T. T. et al. Minireview: Endocrine Disruptors: Past Lessons and Future Directions. **Molecular Endocrinology**, v. 30, n. 8, p. 833–847, 1 ago. 2016.

SCHWEIKERT, K.; BURRITT, D. J. The organophosphate insecticide Coumaphos induces oxidative stress and increases antioxidant and detoxification defences in the green macroalgae *Ulva pertusa*. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 122–123, p. 86–92, 15 out. 2012.

SHI, W. et al. Removal of estrone, 17 α -ethinylestradiol, and 17 β -estradiol in algae and duckweed-based wastewater treatment systems. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 17, p. 824–833, 2010.

SILVA, C. P.; OTERO, M.; ESTEVES, V. Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: a review. **Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)**, v. 165, p. 38–58, jun. 2012.

SIMMLER, C. et al. Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 25, p. 51–59, 2014.

SLAMA, R. et al. Scientific Issues Relevant to Setting Regulatory Criteria to Identify Endocrine-Disrupting Substances in the European Union. **Environmental health perspectives**, v. 124, n. 10, p. 1497–1503, out. 2016.

SNYDER, L. R. Classification of the solvent properties of common liquids. **Journal of Chromatography A**, v. 92, p. 223–230, 1974.

SODRÉ, F. F. et al. Ocorrência de Interferentes Endócrinos e Produtos Farmacêuticos em Águas Superficiais da Região de Campinas (SP, Brasil). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, n. 2, p. 187–196, 2007.

SODRÉ, F. F. et al. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 96, n. 1, p. 92–98, set. 2010.

SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Occurrence of Emerging Contaminants in Brazilian Drinking Waters: A Sewage-To-Tap Issue. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 206, p. 57–67, 2 fev. 2010.

SPERLING, M. VON. **Urban wastewater treatment in Brazil** IADB - Inter-American Development Bank. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://publications.iadb.org/publications/english/document/Urban-Wastewater-Treatment-in-Brazil.pdf>>. Acesso em: 29 out. 2019.

STRATTON, G. W. The Influence of Solvent Type on Solvent-Pesticide Interactions in Bioassays. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 14, p. 651–658, 1985.

STRATTON, G. W.; SMITH, T. M. Interaction of Organic Solvents with the Green Alga *Chlorella pyrenoidosa*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol. Environmental Contamination and Toxicology**, v. 40, p. 736–742, 1988.

TEICHBERG, M. et al. Nitrate reductase and glutamine synthetase activity, internal N pools, and growth of *Ulva lactuca*: responses to long and short-term N supply. **Mar Biol**, v. 151, p. 1249–1259, 2007.

TERNES, T. A. et al. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **The Science of the total environment**, v. 225, p. 81–90, 12 jan. 1999.

TORRES, M. A. et al. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 1, p. 1–15, 2008.

TULPAN, D. et al. MetaboHunter: An automatic approach for identification of metabolites from ¹H-NMR spectra of complex mixtures. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n. 400, p. 1–22, 2011.

U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Federal Register :: Drinking Water Contaminant Candidate List 4-Final**. Disponível em:

<<https://www.federalregister.gov/documents/2016/11/17/2016-27667/drinking-water-contaminant-candidate-list-4-final>>. Acesso em: 30 out. 2019.

ULRICH, E. L. et al. BioMagResBank. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. Database issue, 2008.

URAIKONG, C. et al. A survey of 17 α -ethinylestradiol and mestranol residues in Hawkesbury River, Australia, using a highly specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) demonstrates the levels of potential biological significance. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 144, p. 585–592, 2017.

VIANT, M. R. Recent developments in environmental metabolomics. **Molecular BioSystems**, v. 4, p. 980–986, 2008.

VILLAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise do Metaboloma: Uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. **Biociência**, v. IX, n. 36, 2006.

WAN, A. H. L. et al. Assessment and Characterisation of Ireland's Green Tides (Ulva Species). **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0169049 (1-23), 3 jan. 2017.

WANG, P.; WONG, M. H.; TAM, N. F. Y. Antioxidant responses of two microalgae, *Selenastrum capricornutum* and *Chlorella* sp., to estradiol and ethinylestradiol. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 3, p. 891–903, 20 dez. 2012.

WANG, Y. et al. Biotransformation of estrone, 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol by four species of microalgae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 180, p. 723–732, 2019.

WEBB, S. et al. Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water. **Toxicology Letters**, v. 142, p. 157–167, 2003.

WELJIE, A. M. et al. Targeted profiling: Quantitative analysis of 1H NMR metabolomics data. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 13, p. 4430–4442, 2006.

WELLER, P.; BREITHAUPT, D. E. Identification and Quantification of Zeaxanthin Esters in Plants using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 24, p. 7044–7049, 2003.

WHO/PCS/EDC. Chapter 1 : Executive Summary Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. International Programme on Chemical Safety. In: DAMSTRA, T. et al. (Eds.). . **Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors**. [s.l.] WHO/IPCS, 2002. p. 1–6.

WICHARD, T. et al. The green seaweed *Ulva*: a model system to study morphogenesis. **Frontiers in plant science / Plant Evolution and Development**, v. 6, n. 72, p. 1–6, 2015.

WISE, A.; O'BRIEN, K.; WOODRUFF, T. Are oral contraceptives a significant contributor to the estrogenicity of drinking water? **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 1, p. 51–60, 2011.

WISHART, D. S. et al. HMDB 3.0-The Human Metabolome Database in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D801–D807, 2013.

XIE, Z. et al. Occurrence, bioaccumulation, and trophic magnification of pharmaceutically active compounds in Taihu Lake, China Zhengxin. **Chemosphere**, v. 138, p. 140–147, 2015.

XIE, Z. et al. Bioaccumulation and trophic transfer of pharmaceuticals in food webs from a large freshwater lake. **Environmental Pollution**, v. 222, p. 356–366, 2017.

XU, W. et al. Endocrine-disrupting chemicals in the Pearl River Delta and coastal environment: sources, transfer, and implications. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 36, p. 1095–1104, 2014.

YAMAMOTO, O. et al. An integrated spectral data base system including IR, MS, 1H-NMR, 13C-NMR, ESR and Raman spectra. **Analytical Sciences**, v. 4, p. 233–239, 1988.

YANG, L. et al. Partitions and vertical profiles of 9 endocrine disrupting chemicals in an estuarine environment: Effect of tide, particle size and salinity. **Environmental Pollution**, v. 211, p. 58–66, 2016.

YING, G.-G. G. et al. Decay of endocrine-disrupting chemicals in aerobic and anoxic groundwater. **Water Research**, v. 42, n. 4–5, p. 1133–1141, fev. 2008.

YING, G.-G.; KOOKANA, R. S. Degradation of Five Selected Endocrine-Disrupting Chemicals in Seawater and Marine Sediment. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 7, p. 1256–1260, 2003.

YING, G.-G.; KOOKANA, R. S.; DILLON, P. Sorption and degradation of selected five endocrine disrupting chemicals in aquifer material. **Water research**, v. 37, n. 15, p. 3785–91, set. 2003.

YING, G.-G.; KOOKANA, R. S.; RU, Y.-J. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. **Environment International**, v. 28, n. 6, p. 545–551, dez. 2002.

YOUNG, A. J. Factors that affect the carotenoid composition of higher plants and algae. In: **Carotenoids in Photosynthesis**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1993. p. 160–205.

ZHENG, C. et al. Identification and quantification of metabolites in ^1H NMR spectra by Bayesian model selection. **Bioinformatics**, v. 27, n. 12, p. 1637–1644, 15 jun. 2011.

ZOELLER, T. R. et al. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: A statement of principles from the Endocrine Society. **Endocrinology**, v. 153, n. 9, p. 4097–4110, 2012.

ZUO, Y.; ZHANG, K.; DENG, Y. Occurrence and photochemical degradation of 17α -ethinylestradiol in Acushnet River Estuary. **Chemosphere**, v. 63, p. 1583–1590, 2006.

APÊNDICE A – Publicação com dados da tese apresentados pela autora no PACBB 2018
(*Practical Applications of Computational Biology and Bioinformatics, 12th International Conference*)



17 α -Ethinylestradiol Analysis of Endo- and Exometabolome of *Ulva lactuca* (Chlorophyta) by ¹H-NMR Spectroscopy and Bioinformatics Tools

Debora Cabral¹(✉), Sara Cardoso², Silvana Rocco³, Maurício Sforça³,
Simone Fanan Hengeltraub¹, Cláudia Bauer¹, Miguel Rocha²,
and Marcelo Maraschin¹

¹ Plant Morphogenesis and Biochemistry Laboratory,
Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil
cabraldq@gmail.com

² Centre of Biological Engineering, University of Minho,
Braga, Portugal

³ Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio/CNPq),
Campinas, SP, Brazil
<http://ufsc.br>, <http://www.uminho.pt>,
<http://lnbio.cnpem.br>

Abstract. The uptake of 17 α -ethinylestradiol (EE2) by the green alga *Ulva lactuca* and its effects on the metabolome of that macroalgae have been investigated using ¹H-NMR spectroscopy. To this end, *U. lactuca in vitro* cultures have been acutely (48 h) exposed to the estrogen and both, endo- and exometabolome were investigated. Bioinformatic analyses were performed to integrate and analyze endo- and exometabolic profiles allowing the detection of EE2 into exometabolome samples and identifying very important parameters (VIPs), i.e., ¹H-NMR resonances, responsible for grouping similar *U. lactuca* metabolic profiles and biochemical phenotypes.

Keywords: *Ulva lactuca* · 17 α -ethinylestradiol · NMR spectroscopy
Endometabolome · Exometabolome

1 Introduction

The concern about the frequent occurrence of 17 α -ethinylestradiol (EE2) in aquatic systems and how it affects exposed organisms widely increased in the last years. Environmental metabolomics is an appealing field for assessing xenobiotics effects on natural ecosystems. Measuring changes on the composition and concentration of metabolites provide a reliable picture of cellular state of an organism and reflects the transient phenotype acquired during its interaction with the environment [1, 2]. However, assessing and analyzing the metabolic complexity of biological samples may be challenging [3]. Kuhlisch and Pohnert [4] highlighted the variety of molecules, ranging from highly polar to hydrophobic metabolites, with diverse molecular weights

found in marine seawater matrix. Although marine chemical ecology matured for at least three decades and generated extensive lists of marine metabolites [5], information about metabolic dynamics and composition is still elusive for some group of organisms as macroalgae [3].

Macroalgae are well referred to as efficient biomonitors for measuring bioavailable contaminants in oceans [6, 7]. Chakraborty et al. [8] pointed *U. lactuca* (Chlorophyta) as a potential biomonitor for metal pollution by determining the total metal content in the algal biomass. Henriques et al. [9] confirmed the species effectiveness in the removal of metals from seawater due to the bioconcentration of Pb, Cd, and Hg in alga tissues well above those found in the medium. Spore germination and gametophyte growth of *U. pertusa* were also proposed as sensitive monitors not only for metals (Cu, Zn, and Cd), but also for other pollutants such as formalin and TBTO (an organotin compound used as a biocide and preservative) [10]. Besides, marine photosynthetic organisms have been used in toxicological studies of exposure to hydrocarbons [11, 12], endocrine disruptors compounds (EDCs) [13–17], pesticides [18], and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), most of them with phytoplankton models.

Chaudhuri et al. [6] suggested that macroalgae would be a better indicator of heavy metals in the dissolved phase, than lipophilic compounds that would not be readily taken, due to macroalgae low lipid content. Notwithstanding, studies have evaluated macroalgae as good biological models for monitoring the toxic effects of hydrophobic molecules. For example, relevant metabolic changes resulting from *Hypnea musciformis* exposed to diesel oil [12] and *U. lactuca* to gasoline [11] have been detected, e.g., cell wall thickness and alteration of metabolic signatures such as chlorophyll or carotenoid contents, pointing to seaweed species as biological indicators of eventual impacts of petroleum derivatives on the marine environment. Schweikert et al. [18] tested the exposition of *U. pertusa* to the insecticide Coumaphos, detecting oxidative damages to the cells and increased antioxidant scavenging and GST activities.

The cosmopolitan green alga *U. lactuca* highlights by tolerating wide ranges of salinity (2–35‰), temperature, light irradiance, nutrient concentrations [19, 20] and some pollutants as described above. Its ecological plasticity and ability of rapidly respond to short-term N inputs allow it to eventually dominates shores highly impacted by anthropogenic activities [21, 22] which reinforce the convenience of its use as study model for toxicity effects of xenobiotics, bioindicators of environmental quality, and water remediation.

In this work, *U. lactuca* was exposed to EE2 for 48 h. Both, endo- and exometabolome were investigated for the first time using ¹H-NMR spectroscopy and bioinformatics tools. This preliminary study shed a light on unprecedented results and enabled the use of general ¹H-NMR resonances for discriminating treatments and understanding changes on *U. lactuca* metabolic profiles and biochemical phenotypes when exposed to xenobiotics.

2 Methods

2.1 Experimental Design

The experiment was carried using a stable *in vitro* culture of *Ulva lactuca* which has been maintained for at least 2 years under 25 ± 2 °C, 12–12 h photoperiod (280 ± 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$, cool-white fluorescent lamps), and constant aeration. Experiments began two days after cutting 8 mm discs of alga thalli, which were inoculated into seawater enriched with 25% (v/v) Provasoli solution [23] as culture medium.

17 α -Ethinylestradiol (EE2, $\geq 98\%$ purity, Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany) stock solutions were prepared in ethanol 50% (v/v) and added to Provasoli medium (25%, v/v) to a final concentration 0.1 mL/L of solvent. The same concentration of ethanol was added to the control samples. Extra triplicates of control with no solvent were also included as a reference of alga basal metabolic state. Algae were exposed to 1 mg/L EE2 for 48 h and each replicate contained 5 discs (0.007 ± 0.0005 g DW) into 100 mL culture medium. Triplicates of each EE2 treatment, basal, and control discs were sampled at 0 h and 48 h, immediately washed with cold ammonium formate (0.5 M) and distilled water and freeze-dried. For exometabolome analysis, 10 mL culture medium of each replicate per treatment were assembled to form a pool and then freeze-dried.

2.2 Endo- and Exometabolome Extraction

Endometabolome. Freeze-dried biomass (20 mg) were extracted with 4.5 mL 70% methanol (v/v) containing 0.20 g/l ribitol (Sigma-Aldrich, MO, USA) as internal standard. Solution was kept from light at 4 °C for 2 h and cold-sonicated for 20 min. Extract was then centrifuged (10 min, 4000 rpm) and 1 mL supernatant of each replicate per treatment was collected and assembled to form a pool (3 mL) which was freeze-dried for further $^1\text{H-NMR}$ analysis.

Exometabolome. About 1.5 g of the resulting salt from the freeze-dried process was diluted with 30 mL of an ethyl acetate: water (1: 2, v/v) solution, stirred (10 min) and sonicated (10 min). After that, solution was poured into dark separation funnel (60 mL) and allowed to stand for 1 h, at 4 °C. The aqueous phase was discarded, and the organosolvent was vacuum dried and kept sealed (-20 °C) until $^1\text{H-NMR}$ analysis.

2.3 $^1\text{H-NMR}$ Spectroscopy

For the lyophilized extracts, 650 μl methanol- d_4 (Merck) containing 0.024% (w/v) sodium 3-trimethylsilyl propionate- d_4 (TSP- d_4) as internal standard were added, filtered (0.22 μm) and transferred to a 5 mm NMR tube for subsequent analysis. The $^1\text{H-NMR}$ spectra were recorded on an Agilent DD2 spectrometer (Brazilian Biosciences National Laboratory - Brazilian Center for Research in Energy and Materials - CNPEM), operating at 500 MHz ^1H frequency, at 25 °C, as described by Maraschin et al. [24]. For the endometabolome analysis, a total of 256 scans (23 min acquisition)

were performed, while for the exometabolome samples, due to its lower concentration of compounds, 512 scans were collected (46 min acquisition).

¹H-NMR spectra pre-processing consisted of baseline correction using the Chemomx platform (v. 8.2), as the ACD software (v. 12.01) was used for internal standard reference (TSP-d4) and peak identification. Chemical shifts are expressed in δ ppm referenced to the TSP peak at δ_{1H} 0.00 ppm. From the processed full spectra dataset (0.20–13.00 ppm) a resulting data matrix containing the ¹H-NMR chemical shifts (ppm) was generated, considering a value of 0.0002 unity as minimum normalized intensity.

2.4 Bioinformatic Analysis

Scripts using the R scientific computing system (<http://www.r-project.org>) were written using tools defined through the *specmine* package. Thus, hierarchical cluster analysis (HCA) was applied to the data matrix containing the ¹H-NMR chemical shifts (0.20–13.00 ppm) to detect eventual similarities of metabolic profiles among the investigated samples. EE2 and ribitol ¹H-NMR reference spectra were used for purpose of identification of those analytes in the spectra of the algal samples using the R code developed by Jacob et al. (25). Peak alignment grouped peaks together according to their position using a moving window of 0.01 ppm for matching regarding the reference compounds.

3 Results and Discussion

3.1 Identification of Xenobiotic in Complex Matrices

The effects of 17 α -ethinylestradiol (EE2) on the *U. lactuca*'s metabolome were assessed on the alga tissue and culture medium extracts. As a first approach, identification of xenobiotic was aimed. By employing ¹H-NMR spectroscopy to the analysis of such chemically complex matrix, the used algorithm efficiently identified EE2 into exometabolome extracts using ¹H aromatic resonances matches (e.g. 6.3, 6.46, and 7.07 ppm) from the NMR spectra of the xenobiotic standard and algal samples. Using these approach, peaks referred to EE2 were also matched with the reference peaks of other metabolites.

EE2 was neither identified into endometabolome nor in exometabolome of control samples. The estrogen was only detected in exposed samples of exometabolome, with 72% (0 h) and 46% (48 h) matches from all identified EE2 peaks. Due to the high percentage of EE2 peaks matching with reference signals of metabolites from the complex biological samples, the ¹H-NMR data set was filtered considering as identified only metabolites with score higher than 0.05. In this way, resonances at 6.46 ppm only matched with EE2, while with a higher score, i.e., 0.1, other two signals at 6.52 ppm and 7.07 ppm also matched EE2 in the exometabolome of exposed samples. Alga samples collected on time 0 h presented intensities of peaks matching EE2 higher than those collected after 48 h of exposure, suggesting an eventual degradation of that compound.

were performed, while for the exometabolome samples, due to its lower concentration of compounds, 512 scans were collected (46 min acquisition).

¹H-NMR spectra pre-processing consisted of baseline correction using the Chemomx platform (v. 8.2), as the ACD software (v. 12.01) was used for internal standard reference (TSP-d4) and peak identification. Chemical shifts are expressed in δ ppm referenced to the TSP peak at δ_{1H} 0.00 ppm. From the processed full spectra dataset (0.20–13.00 ppm) a resulting data matrix containing the ¹H-NMR chemical shifts (ppm) was generated, considering a value of 0.0002 unity as minimum normalized intensity.

2.4 Bioinformatic Analysis

Scripts using the R scientific computing system (<http://www.r-project.org>) were written using tools defined through the *specmine* package. Thus, hierarchical cluster analysis (HCA) was applied to the data matrix containing the ¹H-NMR chemical shifts (0.20–13.00 ppm) to detect eventual similarities of metabolic profiles among the investigated samples. EE2 and ribitol ¹H-NMR reference spectra were used for purpose of identification of those analytes in the spectra of the algal samples using the R code developed by Jacob et al. (25). Peak alignment grouped peaks together according to their position using a moving window of 0.01 ppm for matching regarding the reference compounds.

3 Results and Discussion

3.1 Identification of Xenobiotic in Complex Matrices

The effects of 17 α -ethinylestradiol (EE2) on the *U. lactuca*'s metabolome were assessed on the alga tissue and culture medium extracts. As a first approach, identification of xenobiotic was aimed. By employing ¹H-NMR spectroscopy to the analysis of such chemically complex matrix, the used algorithm efficiently identified EE2 into exometabolome extracts using ¹H aromatic resonances matches (e.g. 6.3, 6.46, and 7.07 ppm) from the NMR spectra of the xenobiotic standard and algal samples. Using these approach, peaks referred to EE2 were also matched with the reference peaks of other metabolites.

EE2 was neither identified into endometabolome nor in exometabolome of control samples. The estrogen was only detected in exposed samples of exometabolome, with 72% (0 h) and 46% (48 h) matches from all identified EE2 peaks. Due to the high percentage of EE2 peaks matching with reference signals of metabolites from the complex biological samples, the ¹H-NMR data set was filtered considering as identified only metabolites with score higher than 0.05. In this way, resonances at 6.46 ppm only matched with EE2, while with a higher score, i.e., 0.1, other two signals at 6.52 ppm and 7.07 ppm also matched EE2 in the exometabolome of exposed samples. Alga samples collected on time 0 h presented intensities of peaks matching EE2 higher than those collected after 48 h of exposure, suggesting an eventual degradation of that compound.

Maes et al. [26] evaluated the EE2 uptake from the water-phase by the microalga *Desmodesmus subspicatus* (Chlorophyta) exposed for 72 h and estimated a half-life of the xenobiotic in cultured conditions. Authors reported EE2 transformation into more lipophilic molecules, e.g., monobrominated EE2 (Br-EE2) and dibrominated EE2 (Br₂-EE2). In turn, Lai et al. [27] found EE2 stable when investigated its biotransformation by *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta) exposed for 48 h. Degradation studies of natural and synthetic estrogens usually highlight the overall concern about longer the half-life of EE2, considering it is an estrogenic hormone with higher endocrine disruptor potency when compared with natural ones, e.g., estrone and estradiol [28]. The possibility that a cosmopolitan alga with high environmental plasticity may biotransform a potent and persistent estrogen is exciting at first. Still, if higher toxicity of subproducts as the brominated-EE2 forms [26] is confirmed, the presence of this xenobiotic in natural waters might be of bigger concern than anticipated. From our results, remains the need to confirm by which means EE2 would have been lowered in the water phase. Besides, the importance of unravelling not only the EE2 effects, but its overall interaction in the environment is highlighted.

When considering an analytical approach based on the reference spectrum of both, EE2 and Adonitol, available at an external database (i.e., Human Metabolome Database), the algorithm was not capable of identifying the targeted estrogen in the samples studied. This is because the efficiency for detecting the target compound in biologic samples is clearly lower for compounds extracted using distinct conditions from the considered samples, as well as due to different spectrum acquisition conditions (solvents and pH, e.g.).

Hierarchical clustering analysis was applied to the ¹H-NMR data set and two clades were observed for samples from endometabolome and from exometabolome (Fig. 1). Despite significant differences were not observed when considering exposure times or EE2 concentration, the results allow to infer a grouping tendency of exposed samples according to their endometabolome. Considering the small set of samples, non-parametric Kruskal-Wallis tests were also carried out to identify the most important resonances for endo- and exometabolome discrimination. When considering all samples, 72 out of 138 resonances showed to be relevant for grouping ($p < 0.05$). From these, p-values of 10 signals (1.24, 1.53, 7.17, 7.20, 7.55, 7.57, 7.62, 7.86, 7.94, and 7.97) were lower than 0.004, which highlights the spectral window at 7.0-8.0 ppm containing many peaks with high dissimilarities. Belhaj et al. [15] investigated metabolic changes in phytoplankton exposed to EE2 and found increments of some carbohydrates and fatty acids while photosynthetic pigments were reduced.

The capacity of the algorithm to identify EE2 in the algal samples varied according to the exposure time and concentration of EE2. The endo and exometabolome ¹H-NMR spectra were analyzed using HCA and in this case, the grouping of samples resulted from their endometabolome profiles over the EE2 exposure times seemed to be favoured rather than the amounts of the xenobiotic. When considering basal and control samples in the endometabolome cluster, sampling time also seemed to be more relevant than the presence of ethanol in control samples. In turn, endometabolome samples did not follow grouping for exposition times or concentrations of EE2. As for exometabolome metabolite contents were very low, eventually masking tenuous differences among the samples.

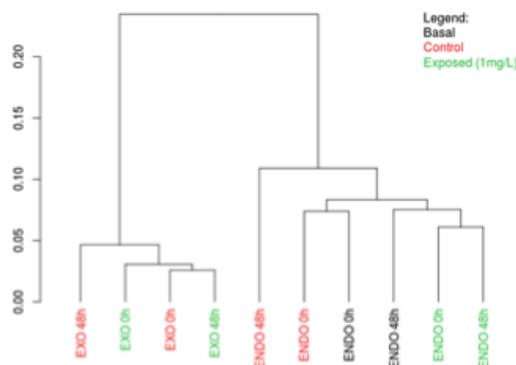


Fig. 1. Hierarchical cluster of the endo- and exometabolome samples of *Ulva lactuca*, coloured by treatments according to EE2 exposure.

4 Conclusion

The analytical approach coupled to the bioinformatics tools adopted in this study seems to be suitable for investigating EE2 in both endo- and exometabolome of *U. lactuca*. Further experimental work is required before validating a certain algorithm for identifying compounds of complex matrix using exclusively external databases as herein shown. However, the analytical approach adopted seems to be suitable for the 17 α -ethinylestradiol identification in biological samples, providing that the NMR spectra are acquired at same conditions of those used by the reference analytical compound as herein noted.

Finally, our findings on the structural elucidation of the *U. lactuca*'s endo and exometabolome shed some light on certain metabolite classes EE2 may affect, addressing further metabolome studies. Whether EE2 was hydrolyzed or biotransformed by alga was not the aim of this study, but it is certainly an interesting question to be later investigated.

Acknowledgements. The authors are thankful to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for financial support and to the research fellowship from CNPq (grant 307099/2015-6) on behalf of M. Maraschin. This study was also supported by the Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT) under the scope of the strategic funding of UID/BIO/04469/2013 unit and COMPETE 2020 (POCI-01-0145-FEDER-006684) and BioTecNorte operation (NORTE-01-0145-FEDER-000004) funded by European Regional Development Fund under the scope of Norte2020 - Programa Operacional Regional do Norte. This work is co-funded by the North Portugal Regional Operational Programme, under the "Portugal 2020", through the European Regional Development Fund (ERDF), within project SISBI- RefaNORTE-01-0247-FEDER-003381.

Conflict of interest statement. Authors state no conflict of interest. All authors have read the journal's Publication ethics and publication malpractice statement available at the journal's website and hereby confirm that they comply with all its parts applicable to the present work.

References

1. Lankadurai, B.P., Nagato, E.G., Simpson, M.J.: Environmental metabolomics: an emerging approach to study organism responses to environmental stressors. *Environ. Rev.* **21**(3), 180–205 (2013)
2. Patti, G.J., Yanes, O., Siuzdak, G.: Innovation: metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**(4), 263–269 (2012)
3. Gupta, V., Thakur, R.S., Reddy, C.R.K., Jha, B.: Central metabolic processes of marine macrophytic algae revealed from NMR based metabolome analysis. *R. Soc. Chem.* **3**, 7037–7047 (2013)
4. Kuhlisch, C., Pohnert, G.: Metabolomics in chemical ecology. *Nat. Prod. Rep.* **32**(7), 937–955 (2015)
5. Hay, M.E.: Marine chemical ecology: what's known and what's next? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **200**, 103–134 (1996)
6. Chaudhuri, A., Mitra, M., Havrilla, C., Waguespack, Y., Schwarz, J.: Heavy metal biomonitoring by seaweeds on the Delmarva Peninsula, East Coast of the USA. *Bot. Mar.* **50**, 151–158 (2007)
7. Torres, M.A., Barros, M.P., Campos, S.C.G., Pinto, E., Rajamani, S., Sayre, R.T., et al.: Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **71**(1), 1–15 (2008)
8. Chakraborty, S., Bhattacharya, T., Singh, G., Maity, J.P.: Benthic macroalgae as biological indicators of heavy metal pollution in the marine environments: a biomonitoring approach for pollution assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **100**, 61–68 (2014)
9. Henriques, B., Rocha, L.S., Audia, C., Lopes, B., Figueira, P., Duarte, A.C., et al.: A macroalgae-based biotechnology for water remediation: simultaneous removal of Cd, Pb and Hg by living *Ulva lactuca*. *J. Environ. Manage.* **191**, 275–289 (2017)
10. Han, T., Choi, G.-W.: A novel marine algal toxicity bioassay based on sporulation inhibition in the green macroalga *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Aquat. Toxicol.* **75**, 202–212 (2005)
11. Pilatti, F.K., Ramlov, F., Schmidt, E.C., Kreusch, M., Pereira, D.T., Costa, C., et al.: *In vitro* exposure of *Ulva lactuca* Linnaeus (Chlorophyta) to gasoline – Biochemical and morphological alterations. *Chemosphere* **156**, 428–437 (2016)
12. Ramlov, F., Carvalho, T.J.G., Schmidt, É.C., Martins, C.D.L., Kreusch, M.G., de Oliveira, E.R., et al.: Metabolic and cellular alterations induced by diesel oil in *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* **26**(4), 1879–1888 (2013)
13. Shi, W., Wang, L., Rousseau, D.P.L., Lens, P.N.L.: Removal of estrone, 17 α -ethynylestradiol, and 17 β -estradiol in algae and duckweed-based wastewater treatment systems. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **17**(4), 824–833 (2010)
14. Lai, K.M., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N.: Biotransformation and bioconcentration of steroid estrogens by *Chlorella vulgaris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(2), 859–864 (2002)
15. Belhaj, D., Athmouni, K., Frikha, D., Kallel, M., El Feki, A., Maalej, S., et al.: Biochemical and physiological responses of halophilic nanophytoplankton (*Dunaliella salina*) from exposure to xeno-estrogen 17 α -ethynylestradiol. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **24**, 7392–7402 (2017)
16. Pocock, T., Falk, S.: Negative impact on growth and photosynthesis in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in the presence of the estrogen 17 α -ethynylestradiol. *PLoS ONE* **9**(10), e109289 (2014)

17. Hom-Díaz, A., Llorca, M., Rodríguez-Mozaz, S., Vicent, T., Barceló, D., Blázquez, P.: Microalgae cultivation on wastewater digestate: β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol degradation and transformation products identification. *J. Environ. Manage.* **155**, 106–113 (2015)
18. Schweikert, K., Burritt, D.J.: The organophosphate insecticide Coumaphos induces oxidative stress and increases antioxidant and detoxification defences in the green macroalgae *Ulva pertusa*. *Aquat. Toxicol.* **122–123**, 86–92 (2012)
19. Folmar, L., Hemmer, M., Hemmer, R., Bowman, C., Kroll, K., Denslow, N.: Comparative estrogenicity of estradiol, ethynyl estradiol and diethylstilbestrol in an *in vivo*, male sheephead minnow (*Cyprinodon variegatus*), vitellogenin bioassay. *Aquat. Toxicol.* **49**(1–2), 77–88 (2000)
20. Messyasz, B., Rybak, A.: Abiotic factors affecting the development of *Ulva* sp. (Ulvo-phyceae; Chlorophyta) in freshwater ecosystems. *Aquat. Ecol.* **45**(1), 75–87 (2011)
21. Arévalo, R., Pinedo, S., Ballesteros, E.: Changes in the composition and structure of Mediterranean rocky-shore communities following a gradient of nutrient enrichment: descriptive study and test of proposed methods to assess water quality regarding macroalgae. *Mar. Pollut. Bull.* **55**(1–6), 104–113 (2007)
22. Teichberg, M., Heffner, L.R., Fox, S., Valiela, I.: Nitrate reductase and glutamine synthetase activity, internal N pools, and growth of *Ulva lactuca*: responses to long and short-term N supply. *Mar. Biol.* **151**, 1249–1259 (2007)
23. Starr, R.C., Zeikus, J.A.: UTEX-The culture collection of algae at the University of Texas at Austin 1993 List of Cultures. *J. Phycol.* **29**(s2), 1–106 (1993)
24. Maraschin, M., Somensi-Zeggio, A., Oliveira, S.K., Kuhn, K., Tomazzoli, M., Raguzzoni, J.C., et al.: Metabolic profiling and classification of propolis samples from southern Brazil – a NMR-based platform coupled with machine learning. *J. Nat. Prod.* **79**, 13–23 (2016)
25. Jacob, D., Deborde, C., Moing, A.: An efficient spectra processing method for metabolite identification from ¹H-NMR metabolomics data. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 5049–5061 (2013)
26. Maes, H.M., Maletz, S.X., Ratte, H.T., Hollender, J., Schaeffer, A.: Uptake, elimination, and biotransformation of 17 α -Ethinylestradiol by the Freshwater Alga *Desmodesmus subspicatus*. *Environ. Sci. Technol.* **48**(20), 12354–12361 (2014)
27. Lai, K.M., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N.: Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems. *Sci. Total Environ.* **289**, 159–168 (2002)
28. Ying, G.-G., Kookana, R.S., Ru, Y.-J.: Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environ. Int.* **28**(6), 545–551 (2002)

ANEXO A – Glossário de indicadores operacionais de água e esgotos

IN055 - Índice de atendimento total de água	
Forma de cálculo	Informações envolvidas
$\frac{AG001}{12a} \times 100$	AG001: População total atendida com abastecimento de água G12A: População total residente do(s) município(s) com abastecimento de água, segundo o IBGE POP_TOT: População total do município do ano de referência (Fonte: IBGE)
IN023 - Índice de atendimento urbano de água	
Forma de cálculo	Informações envolvidas
$\frac{AG026}{06a} \times 100$	AG026: População urbana atendida com abastecimento de água G06A: População urbana residente do(s) município(s) com abastecimento de água POP_URB: População urbana do município do ano de referência (Fonte: IBGE)
IN056 - Índice de atendimento total de esgoto referido aos municípios atendidos com água	
Forma de cálculo	Informações envolvidas
$\frac{ESO01}{12a} \times 100$	ES001: População total atendida com esgotamento sanitário G12A: População total residente do(s) município(s) com abastecimento de água, segundo o IBGE G12B: População total residente do(s) município(s) com esgotamento sanitário, segundo o IBGE POP_TOT: População total do município do ano de referência (Fonte: IBGE)
IN024 - Índice de atendimento urbano de esgoto referido aos municípios atendidos com água	
Forma de cálculo	Informações envolvidas
$\frac{ESO26}{06a} \times 100$	ES026: População urbana atendida com esgotamento sanitário G06A: População urbana residente do(s) município(s) com abastecimento de água G06B: População urbana residente do(s) município(s) com esgotamento sanitário POP_URB: População urbana do município do ano de referência (Fonte: IBGE)

IN046 - Índice de esgoto tratado referido à água consumida	
Forma de cálculo	Informações envolvidas
$\frac{ES006 + ES015}{AG010 - AG019} \times 100$	AG010: Volume de água consumido AG019: Volume de água tratada exportado ES006: Volume de esgotos tratado ES015: Volume de esgoto bruto exportado tratado nas instalações do importador
IN016 - Índice de tratamento de esgoto	
Forma de cálculo	Informações envolvidas
$\frac{ES006 + ES014 + ES015}{ES005 + ES013} \times 100$	ES005: Volume de esgotos coletado ES006: Volume de esgotos tratado ES013: Volume de esgotos bruto importado ES014: Volume de esgoto importado tratado nas instalações do importador ES015: Volume de esgoto bruto exportado tratado nas instalações do importador

Fonte: Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS, 2019).

ANEXO B – Efeitos do EE2 em organismos aquáticos

Espécies	Critério de resposta	Sexo	Período de exposição	Concentração (ng/L)	Efeitos	Referências
Peixes de água doce						
Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	Sobrevivência e proporção sexual	M	2 meses	10	Aromatase detectada nos testículos	Scholz and Gutzeit (2000)
				100	Todas se desenvolveram como fêmeas (caracteres de barbatana específicos do sexo feminino e presença de gônadas femininas)	
	Parâmetro de crescimento	F		10 e 100	Redução do GSI	
	Produção de ovos	F		10	Redução do número de ovos produzidos por geração	
				100	Nenhum ovo foi gerado	
	Observação histológica	M		1 e 10	Teve estrutura lobular típica	
		F			Estrutura normal de um ovário imaturo contendo diferentes fases do desenvolvimento folicular	
Expressão da aromatase	M		10	Expressão da aromatase (expressão baixa e variável, mas claramente identificável)		
	F			Aumento do nível de expressão gênica de aromatase		
Three-spined stickleback (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)	Parâmetro de crescimento, condição e sobrevivência	F	21 dias	170	NSI mais alto	Andersson et al. (2007)
		M			NSI mais baixo	
		F e M			Mudanças na coloração do período reprodutivo	
					HSI significativamente mais alto	

Espécies	Critério de resposta	Sexo	Período de exposição	Concentração (ng/L)	Efeitos	Referências
	Vitelogenina	M		53.7	60% de acúmulo de líquido na cavidade abdominal Níveis plasmáticos de VTG significativamente mais altos	
		F		170	Níveis plasmáticos de VTG significativamente mais altos	
	<i>Spiggin</i>	F e M		170	Níveis da proteína <i>spiggin</i> significativamente mais baixos	
	Atividade de EROD	F e M		170	Indução de 9 e 8 vezes Menor atividade hepática do EROD normalizada para o conteúdo de proteína microsomal	
Chinese rare minnow (<i>Gabiocypris rarus</i>)	Desenvolvimento de embriões e larvas	F e M		16 e 64	Aumento da mortalidade de alevinos na fase de nado	Zha et al. (2008)
	Morfologia bruta e deformidades	F e MF e M	30 dph	16 e 64	Deformidades	
			90 e 120 dph		Todos os peixes apresentaram deformidades	
	Mortalidade e crescimento	F e M		4	71% apresentaram deformidades	
				4, 16 e 64	Comprimentos de corpo e peso foram significativamente menores	
			90 dph	16 e 64	Quase todos os peixes morreram	
	Índices de tecidos somáticos	F e M	120 dph	4	Mortalidade cumulativa - 76%	
			0,2	Mortalidade cumulativa - menos de 40%		
			16	GSI, HSI e RSI foram significativamente menores que o controle		
			120 dph	0,2, 1 e 4	GSI diminuiu	
			180 dph		HSI aumentado	

Espécies	Critério de resposta	Sexo	Período de exposição	Concentração (ng/L)	Efeitos	Referências
					RSI aumentado	
Juvenile Atlantic Salmon (<i>Salmo salar</i>)	Modulação de receptores hormonais e vias de sinalização	F e M	3 e 7 dias	50 e 5	Expressão ER α foi significativamente diminuída	Mortensen and Arukwe (2007)
			3 e 7 dias	50	Redução na expressão de mRNA de ER β	
			7 dias	5	Aumento dos níveis plasmáticos de VTG	
			7 dias	5	Diminuição da expressão de mRNA das proteínas VTG e Zr	
			3 dias	50	Aumento dos níveis plasmáticos de VTG	
			7 dias	5	Diminuição da expressão de VTG	
	Modulação de receptores-Ah e vias de sinalização		3 dias	50	Aumento significativo de 3,5 vezes da expressão de ARNm de Ah α	
			7 dias	5 e 50	Diminuição significativa de Ah α	
			3 e 7	50 e 5	A expressão do mRNA do CYP1A 1 foi significativamente diminuída	
Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	Comportamento agressivo e mudanças no domínio social	F e M	48 h	0.5, 5.0 e 50	Comportamento agressivo de beliscar diminuiu	Colman et al. (2009)
					Comportamento de afugentar diminuiu significativamente	
	Dominância paterna do comportamento de corte			0.5, 5.0 e 50	Comportamento de cortejo diminuiu	
				0,5	Machos comportamentais dominaram a dominância paterna 72,7%	
				5	Machos comportamentais dominam 100% do domínio paterno	
				50	Apenas 50% dos peixes de comportamento dominante exibiram dominância paterna	
Gulf pipefish (<i>Syngnathus scovelli</i>)	Dinâmica de acasalamento	M	10 dias	1 e 100	Desenvolvido listras laterais iridescentes (normalmente encontradas em pipefish femininos)	Partridge et al. (2010)

Espécies	Critério de resposta	Sexo	Período de exposição	Concentração (ng/L)	Efeitos	Referências
					A atratividade masculina é afetada As fêmeas passaram mais tempo cortejando ativamente (posando e dançando) e realizaram mais contrações para os machos de controle	
Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	Feminização da Ansiedade e comportamento de formação de cardumes	M	14 dias	5 e 25	Aumento da expressão do RNAm hepático da proteína vitelogenina de gema de ovo predominantemente feminina	Reyhanian et al. (2011)
				5	Teve mais latência antes do <i>upswim</i> Menos transições para a metade superior Tempo total mais curto passado na metade superior	
	Fertilização e desova			25	Latência mais curta Visitas mais longas à metade superior	
			48 h	5	Nenhum impacto negativo na taxa de fertilização Em contraste, produziu uma porcentagem significativamente maior de fertilização do que o grupo controle	
				25	Não induziu a desova Nenhum ovo, fertilizado ou não fertilizado	
Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	Sobrevivência e crescimento	M	90 dph	2 e 10	As taxas de mortalidade foram > 60%	Xu et al. (2008)
				10	Peso e comprimento foram significativamente menores que o grupo controle	
	Proporção sexual e histologia de gônada			2	Ovários imaturos foram encontrados / Gônadas continham oócitos em estágios iniciais de desenvolvimento	
				10	Tinha apenas indiferenciados tecidos gonadais. Apenas algumas células germinativas	

Espécies	Critério de resposta	Sexo	Período de exposição	Concentração (ng/L)	Efeitos	Referências
			180	2 e 10	primordiais (PGCs) e tipo-1 células erm localizadas na crista genital Morfologia testicular anormal significativa (malformações do ducto espermático, uma proporção alterada dos tipos de células germinativas e número reduzido de espermatozoides)	
	Indução da vitelogenina		21 dph	10	A expressão do RNAm de VTG foi detectada	
Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	Transcrição gene NER		24 h	1, 10 e 100 nM	Capacidade reduzida de fígado de peixe-zebra (ZFL) para reparar DNA danificado em comparação com as células de controle	Notch and Mayer (2009)
Peixes marinhos						
Sand gobies (<i>Pomatoschistus minutus</i>)	Sistema de acasalamento	M	1–4 semanas	5 e 24	O tamanho para machos tem menor no sucesso de acasalamento, resultando em uma seleção sexual mais fraca no tamanho do macho em comparação com o controle	Saaristo et al. (2009)
	Vitelogenina			24	Níveis de expressão mais elevados que os machos expostos a baixo EE2 HSI foi menor do que no baixo EE2	
Gilthead seabream (<i>Sparus aurata L.</i>)	Níveis de hormônios sexuais e vitelogenina		15 dias 29 dias	5	Um aumento significativo nos T levels Aumento de 650 vezes na expressão do gene VTG	Cabas et al. (2012)
	Expressão de citocinas após imunização		15 e 29 dias	50	A expressão do gene VTG aumenta aproximadamente 40.000 vezes em dias	
	Expressão do gene que codifica E α		15 e 29	5 e 50	Diminuição de forma de indução dose-dependente da 1 L-1 β observada no rim da cabeça de peixes	

Espécies	Critério de resposta	Sexo	Período de exposição	Concentração (ng/L)	Efeitos	Referências
			15 e 29	5 e 50	Aumentou ligeiramente os níveis de RNAm de 1 L - 1 β em peixes imunizados após reforço	
			15 e 29	50	Níveis de RNAm de ER α no rim da cabeça aumentaram	
			15 e 29	50	Combinado com imunização - o transcrito ER α diminuiu	

Fonte: ARIS e colaboradores (2014).

VTG = Proteína Vitelogenina; GSI = índice gonadossomático; HIS = índice hepatossomático; spiggin = glicoproteína responsável pelo muco que mantém a adesão entre ovos recém postos; e EROD = enzima etoxiresorufina-O-desetilase.

ANEXO C – Concentração de compostos estrógenos em diversos países e matrizes

Países	Localização	E1	E2	E3	EE2	Referência
Água (ng/L)						
Estados Unidos	Estuário do rio Acushet	0.73–1.20	0.56–0.83	n.a	3.01–4.67	Zuo et al. (2006)
Estados Unidos	Sul da Florida	0.88–5.20	n.d–1.80	n.a	n.a	Singh et al. (2010)
Irã	Cidade de Hamadam	9.00–2.00	10.00–3.00	n.a	2.00–0.01	Jafari et al. (2009)
Turquia	Bacia hidrográfica de Buyukcekme, Istanbul	1.40–5.74	1.10–5.39	2.15–5.20	11.70–14.00	Aydin and Talinli (2013)
Austrália	South East Queensland	0.55–20.91	0.39–3.77	n.a	0.00–0.52	Ying et al. (2009)
Brasil	Águas superficiais brasileiras	n.d–39.00	n.d–7.30	n.d -2.30	n.d–25.00	Sodré et al. (2010)
República Checa e Alemanha	Rio Elbe e seus afluentes	< 0.20	< 0.20	n.a	< 0.20	Stachel et al. (2003)
Países Baixos	Países Baixos	< 0.30–7.20	< 0.80–1.00	n.a	< 0.30–0.40	Vethaak et al. (2005)
Itália	Rio Lambro	0.05	0	0.05	0	Viganò et al. (2006)
Itália	Lagoa de Veneza, baía fechada do mar Adriático	< 1.20–10.00	< 1.00–175.00	n.a	< 0.80–34.00	Pojana et al. (2007)
Alemanha	Rio Würm	< 0.30–2.00	< 0.30–0.70	n.a	< 0.30–0.70	Bögi et al. (2003)
Taiwan	Rio Dan-Shui, Taipei	22.40–66.20	1.40–33.90	73.60	7.53–27.40	Chen et al. (2007)
China	Baía Jiaozhou, Qingdao	180.00	14.00–n.d -134.00	4.00–94.00	7.00–24.00	Zhou et al. (2011)
China	Área de Tiajin	0.64–55.30	n.d–21.20	n.d–46.40	n.d–24.40	Lei et al. (2009)
China	Guangzhou, Sul da China	n.d–50.00	n.d–2.00	n.d–1.00	n.d	Peng et al. (2008)
China	Lagoa Yundang, China	n.d–5.34	n.d–1.56	n.a	n.d–0.43	Zhang et al. (2011a)
China	Rio Yellow	n.d–15.60	n.d–2.30	n.a	n.a	Wang et al. (2012)
China	Lago Dianchi	n.d	1.90 ± 0.30	n.d	n.d	Liu et al. (2012b)
Sedimento (ng/g peso seco)						
Reino Unido	Rio Ouse	0.40–3.30	< 0.03–1.20	n.a	n.d (< 0.04)	Labadie and Hill (2007)
Europa	Rio European	< 0.50	< 1.00	< 0.05	< 0.10	Schmitt et al. (2010)
França	Norte da França	0.30–1.28	0.18–1.58	n.d–1.26	n.d	Kinani et al. (2010)

Países	Localização	E1	E2	E3	EE2	Referência
Itália	Lagoa de Veneza	n.a	n.a	n.a	< 2.00–	Pojana et al. (2007)
Brasil	Mangue do Itacorubi	0.71–50.75	0.87–40.96	n.a	41.00	Froehner et al. (2012)
Austrália	Malabar, Sydney	0.16–1.17	0.22–2.48	n.a	133.64	Braga et al. (2005)
Japão	Baía de Tokyo	0.08–3.60	n.d–0.59	n.a	< 0.05–0.50	Isobe et al. (2006)
China	Área de Tianjin, Norte da China	0.98–21.60	n.d–9.70	n.d–7.29	n.d–0.34	Lei et al. (2009)
China	Delta do rio Pearl	< 1.30–10.90	< 0.90–2.60	n.a	n.d–9.26	Gong et al. (2011)
China	Baía Xiamen	n.d–7.38	n.d–2.35	n.a	n.d	Zhang et al. (2009)
China	Lagoa Yundang	4.61–11.22	n.d–3.71	n.a	n.d–2.18	Zhang et al. (2011b)
China	Rio Yellow	n.d	n.d	n.a	n.d–2.48	Wang et al. (2012)
China	Rio Licun	3.00– 10.80	n.d–1.20	1.00– 7.60	n.a	Zhou et al. (2011)
					n.d–5.10	

Fonte: ARIS e colaboradores (2014).