

Carla Sofia Gomes Venade

## **Contaminação ambiental por disruptores endócrinos - Estuário do rio Minho**

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Toxicologia e Contaminação Ambientais submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientadora – Doutora Joana Costa Vilhena de Bessa Campos

Categoria – Investigadora Post-doc

Afiliação – Laboratório de Comunidade Marinha, Ecologia e Evolução (LMCEE) no Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR).



## Agradecimentos

Embora todo o empenho realizado para a concretização deste trabalho seja um reconhecimento de trabalho individual, são muitos os contributos de natureza diversa que devem ser realçados. Assim:

A si, Doutora Joana Campos, que foi mais que uma orientadora, uma amiga, agradeço toda a atenção, dedicação, empenho, constante incentivo, incessante ajuda nas diversas dificuldades surgidas ao longo deste trabalho académico, contribuindo em muito para o seu enriquecimento. Um “Muito Obrigada” por ter lutado até ao fim de forma a que este projeto fosse levado a bom porto.

Ao Doutor Vitor Vasconcelos, como Professor e Diretor deste Mestrado, obrigada pelos ensinamentos transmitidos, entusiasmo e dedicação que sempre demonstrou.

A toda a equipa liderada pelo Prof. Doutor Eduardo Rocha e Prof<sup>a</sup>. Doutora Maria João Rocha, agradeço o esforço e dedicação para me ajudar a concluir a entrega deste trabalho incluindo a disponibilidade dos materiais, reagentes, soluções e aparelhos utilizados. Um agradecimento especial para a Catarina Cruzeiro, pelos conselhos, ideias e literatura cedida e à Prof<sup>a</sup>Tânia Madureira, por toda a disponibilidade, atenção e dedicação para comigo nesta etapa final, pois foi um pilar imprescindível para a conclusão deste trabalho. A todos um obrigada por me terem recebido na equipa.

A toda a equipa da Doutora Joana Campos, agradeço à Cláudia Moreira pela orientação inicial e todas as saídas de campo cuja disponibilidade foi sempre incansável e presente. À Rita, à Patrícia, à Paula, ao Zé, ao Zamith e a todos, obrigada por me mostrarem que no “mundo da investigação” existem laboratórios nos quais o companheirismo, a dedicação, o empenho e, acima de tudo, a união de equipa estão presentes.

À Doutora Laura Guimarães pelos ensinamentos transmitidos e por todo o apoio e dedicação para que fosse possível a submissão do presente trabalho académico.

À Filipa, à Lila e ao Mingue, obrigada por serem tão chatos. Foi pela vossa coragem, apoio, abraço, palavras e presença que eu mantive a firmeza. De vós, guardo os bons momentos, agradeço a companhia e jamais esquecerei o valor do simples recarregar de baterias como forma de fortalecer a nossa vontade de fazer valer todos os esforços que os nossos pais fizeram para nos dar um futuro melhor. Porque a vossa amizade é importante, obrigada por fazerem parte da minha vida!

A Ti, obrigada por fazeres de mim um ser melhor!

À Nina e Luna pelo companheirismo. À Ivy por me tirar da rotina. Ao Simão e todos os companheiros de estimação que embora não mencionados são a melhor dádiva que a natureza pode dar ao ser humano!

Aos meus pais e para estes sim, não há palavras que definam o que foram, o que deram e o tanto que tenho para lhes dizer. Um agradecimento não chega e o infinito repleto de um “obrigada por tudo” seria escasso quando comparado com a coragem, a valentia e a vossa forma de ser. Obrigado a vós por me terem dado a oportunidade de realizar este sonho pois sem a vossa ajuda, a vossa força, a vossa presença e a muito custo a vossa dedicação financeira, dificilmente teria terminado o meu curso, a minha formação, a minha construção enquanto profissional. Sem vós, nenhuma das recordações académicas que hoje guardo e em primeira pessoa vivi estariam aqui, neste cantinho do peito sempre aflito “pelos meus”. Não esqueço as minhas irmãs Anabela, Anjos e Fátima pois também delas recebi o impulso necessário para seguir, no momento certo.

Muito obrigada a todos!

**Sofia Venade**

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através do projeto PTDC/MAR/111537/2009 “INPACTAR – Efeitos a longo prazo da intersexualidade e outros impactos em populações de *Echinogammarus marinus*” e pelo Projeto ECORISK (referência NORTE-07-0124-FEDER-000055) enquadrado no Programa Integrado de IC&DT MARVALOR – Building research and innovation capacity for improved management and valorization of marine resources, suportado pelo Programa Operacional Regional do Norte (ON.2 – o Novo Norte) e pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional.



*“Os rios de água podem ser vistos de várias maneiras: ou são estradas que se percorrem, para cima ou para baixo, ou são, quando humedecem a terra, o meio ótimo para a vida germinar das sementes. São também os obstáculos que separam nações e regiões, e os sítios sobre os quais são lançadas as pontes de entendimento...”*

João Conde Veiga

## Resumo

Os níveis de contaminação em vários estuários europeus ameaçam a biodiversidade natural. Compostos tais como estrogénios e/ou mimetizadores de estrogénios podem causar graves perturbações endócrinas em vários organismos, nomeadamente em peixes e invertebrados. Contudo, a investigação sobre os níveis destes compostos em estuários portugueses é escassa. No estuário do rio Minho são poucos os estudos que realçam a importância dos disruptores endócrinos no entanto, os estudos publicados denotam a presença de poluentes como os disruptores endócrinos xenoestrogénicos (EDCs). Atendendo à necessidade de confirmar a presença de alguns EDCs neste estuário, este estudo teve como principais objetivos: (1) a quantificação dos níveis de EDCs, incluindo estrogénios naturais (E2) e sintéticos (EE2) e compostos industriais (BPA); (2) a verificação de possíveis flutuações sazonais nas concentrações de EDCs; (4) a verificação de uma possível variação da concentração dos EDCs em estudo consoante gradientes salinidade. Para tal, este estuário foi amostrado a cada 3 meses em 3 locais ao longo do gradiente de salinidade, durante um ciclo anual. Para a obtenção de valores comparativos referentes a locais contaminados, foram amostrados os estuários do Ave e Mondego, em duas épocas do ano (primavera e inverno). Para a quantificação dos níveis de EDCs foram utilizados imunoensaios ELISA. Apesar das concentrações observadas serem inferiores no Minho do que nos outros dois estuários utilizados como comparação, a contaminação deste estuário parece ser efetuada de forma contínua, pois não se observaram diferenças sazonais. Neste trabalho discute-se ainda a situação dos estuários do Ave e Mondego.

**Palavra-chave:** estuário do rio Minho, Compostos Disruptores Endócrinos (CDEs), hormonas naturais e sintéticas, fenóis, ELISA.

## **Abstract**

The contamination levels of several European estuaries threaten their natural biodiversity. Compounds such as estrogens or estrogen mimics can cause serious endocrine disruption in fish and invertebrates but have been poorly investigated in Portuguese estuaries. In the estuary of the River Minho are few studies that highlight the importance of endocrine disruptors. However, published studies show that the presence of pollutants such as endocrine disruptors or xenoestrogens (EDCs). Given the need to confirm the presence of some EDCs in this estuary, this study had three main objectives: (1) quantifying the levels of EDCs, including natural estrogen (E2) and synthetic (EE2) and industrial compounds (BPA), (2) investigate possible seasonal fluctuations in the concentrations of EDCs and (3) checking for a possible variation of the concentration of EDCs in consonant study salinity gradients. For that, this estuary was sampled every 3 months in 3 sites along the salinity gradient during one annual cycle, and the estuaries of Ave and Mondego were sampled in 2 seasons (spring and winter) to obtain comparative information for polluted areas. ELISA Immunoassays were applied to quantify EDCs concentration levels. Despite the observed concentrations are lower in Minho than in the other two estuaries used as comparison, the contamination of the estuary appears to be performed continuously since seasonal differences were not observed. This work is still discussing the situation of the Ave and Mondego estuaries.

**Keywords:** Minho estuary, Endocrine Disrupting Compounds (EDCs), natural and synthetic hormones, phenols, ELISA.

## Sumário de conteúdos

Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas .....	xii
Lista de Apêndices.....	xiii
Lista de Anexos.....	xiv
Lista de Acrónimos .....	xv
Lista de Símbolos.....	xvii
Capítulo 1 – Introdução Geral .....	1
1.1. Contextualização .....	1
1.2. Importância do estudo .....	2
1.2.1. Objetivo .....	2
1.3. Organização da dissertação .....	3
Capítulo 2 – Enquadramento teórico.....	5
2.1. Contaminação ambiental .....	5
2.2. Contaminação dos ecossistemas aquáticos.....	6
2.3. Contaminantes ambientais .....	8
2.3.1. Compostos Disruptores Endócrinos, EDCs.....	8
2.3.1.1. Fontes de contaminação .....	10
2.3.1.2. Mecanismos de ação.....	11
2.3.2. Caracterização geral dos EDCs em estudo .....	13
2.4. Organismos <i>versus</i> Disrupção endócrina .....	17
2.4.1. Disrupção endócrina por EDCs em meio aquático.....	18
2.4.1.1. Estudos Internacionais .....	19
2.4.1.2. Estudos Nacionais .....	23
2.5. Metodologias de deteção de EDCs.....	26
2.5.1. Metodologias adotadas para a deteção e quantificação dos EDCs em estudo .....	29
2.5.1.1. Imunoensaios ELISA .....	30
Capítulo 3 – Materiais e Métodos.....	31
3.1. Áreas de estudo.....	31
3.1.1. Breve descrição da Bacia Hidrográfica do rio Minho .....	31
3.1.1.1. Pressões antropogénicas.....	33
3.1.2. Apresentação geral dos estuários utilizados na comparação com o estuário do rio Minho .....	34
3.1.2.1. Estuário do rio Ave .....	34
3.1.2.2. Estuário do rio Mondego.....	35
3.2. Amostragem.....	37

3.2.1. Identificação dos pontos de amostragem.....	37
3.2.2. Recolha das amostras.....	39
3.2.3. Parâmetros físico-químicos.....	39
3.3. Metodologias analíticas .....	40
3.3.1. Reagentes e Soluções.....	40
3.3.2. Processamento das amostras .....	41
3.3.2.1. Pré-processamento .....	41
3.3.3. Método para a extração das amostras .....	41
3.3.3.1. Extração em fase sólida.....	41
3.3.4. Detecção e quantificação dos EDCs em estudo.....	43
3.3.4.1. Preparação das amostras.....	44
3.3.4.2. Descrição sucinta do protocolo.....	45
3.3.4.3. Leitura das placas e Software utilizado.....	47
Capítulo 4. Análise e Discussão dos resultados.....	48
4.1. Parâmetros físico-químicos.....	48
4.1.1. Temperatura.....	48
4.1.2. Salinidade .....	49
4.1.3. Condutividade .....	50
4.1.4. Potencial de hidrogénio, pH.....	51
4.1.5. Oxigénio Dissolvido, OD .....	52
4.1.6. Clorofilas, Chl .....	54
4.2. Compostos Disruptores endócrinos.....	55
4.2.1. Concentrações em EDCs.....	56
4.2.1.1. Estuário do rio Minho.....	57
4.2.1.2. Estuário do rio Ave .....	59
4.2.1.3. Estuário do rio Mondego.....	61
4.2.2. Variações sazonais.....	63
4.2.3. Variações ao longo do gradiente de salinidade .....	63
Capítulo 5. Conclusão e perspetivas futuras.....	64
Referências Bibliográficas .....	67
Apêndices.....	80
Anexos.....	83

## Lista de Figuras

---

<b>Figura 1</b> - Esquema representativo de eventuais vias de dispersão de EDCs no ambiente.....	11
<b>Figura 2</b> - Mecanismos de ação dos EDCs. (A) Efeito agonista; (B) Efeito antagonista; (C) Alteração do padrão de síntese e metabolismo; (D) Modificação na expressão dos recetores hormonais. Adaptado de Sosa-Ferrera <i>et al.</i> , 2013. ....	12
<b>Figura 3</b> - Localização do rio Minho. ....	32
<b>Figura 4</b> - Distribuição das necessidades de abastecimento de água para o setor agrícola, industrial, pecuário, urbano e lazer (golfe) a partir do rio Minho. Fonte: APA, 2012. ....	33
<b>Figura 5</b> - Localização das Bacias Hidrográficas do Ave e Mondego. Adaptado do Google Maps.....	37
<b>Figura 6</b> - Localização geográfica das áreas de estudo. (A1) Localização das Bacias Hidrográficas; (B) Localização dos três estuários (B1-rio Minho, B2- rio Ave,B3-rio Mondego); (C) Localização dos pontos de amostragem (C1-rio Minho (Foz, Ferry e Sapal); C2-rio Ave (Estaleiro, Canal e Praia); C3-rio Mondego (Doca, Armazéns e Pranto). Adaptado do Google Maps.....	38
<b>Figura 7</b> - Esquema geral do método analítico utilizado para a pré-concentração das amostras de água e posterior quantificação dos EDCs. Adaptado de Ribeiro <i>et al.</i> ,2007. ....	42
<b>Figura 8</b> - Principais etapas de manuseamento dos kits ELISA para a análise dos EDCs em estudo.....	46
<b>Figura 9</b> - Média e desvio padrão da variação sazonal da temperatura (°C) ao longo dos três pontos de amostragem. S1 – Foz; S2 - Ferry; S3 - Sapal. ....	49
<b>Figura 10</b> - Média e desvio padrão da variação sazonal da salinidade (psu) ao longo dos três pontos de amostragem. S1 – Foz; S2 - Ferry; S3 - Sapal. ....	50
<b>Figura 11</b> - Média e desvio padrão da variação sazonal da condutividade (mScm <sup>-1</sup> ) ao longo dos três pontos de amostragem. S1 – Foz; S2 - Ferry; S3 - Sapal. ....	51

**Figura 12** - Média e desvio padrão da variação sazonal do pH ao longo dos três pontos de amostragem. S1 – Foz; S2 - Ferry; S3 - Sapal.....52

**Figura 13** - Média e desvio padrão da variação sazonal do oxigênio dissolvido (%) ao longo dos três pontos de amostragem. S1 – Foz; S2 - Ferry; S3 - Sapal.....53

**Figura 14** - Média e desvio padrão da variação sazonal do oxigênio dissolvido ( $\text{mgL}^{-1}$ ) ao longo dos três pontos de amostragem. S1 – Foz; S2 - Ferry; S3 - Sapal.....54

**Figura 15** - Média e desvio padrão da variação sazonal da concentração de clorofilas ( $\mu\text{gL}^{-1}$ ) ao longo dos três pontos de amostragem. S1 - Foz; S2 - Ferry; S3 - Sapal.....55

## Lista de Tabelas

---

<b>Tabela 1</b> - Grupo de EDCs analisados no presente estudo. ....	13
<b>Tabela 2</b> - Propriedades físico-químicas e fontes de dispersão dos EDCs em estudo.....	16
<b>Tabela 3</b> - Estudos internacionais, em espécies aquáticas, nos quais foi detetada a presença dos EDCs em estudo ( $\text{ngL}^{-1}$ ) assim como os efeitos associados às concentrações evidenciadas.....	21
<b>Tabela 4</b> - Estudos realizados em diversos estuários internacionais nos quais foi detetada a presença dos EDC's em estudo. ....	22
<b>Tabela 5</b> - Estudos realizados em diversos estuários nacionais nos quais foi detetada a presença dos EDC's em estudo. ....	24
<b>Tabela 6</b> - Vantagens e inconvenientes das principais técnicas utilizadas para a deteção e quantificação de EDCs em matrizes aquáticas. ....	28
<b>Tabela 7</b> - Metodologias mais utilizadas para a deteção dos compostos em estudo. ....	29
<b>Tabela 8</b> - Média ( $\text{ngL}^{-1}$ ) e coeficiente de variação (%) para os valores de concentração dos três EDC's avaliados nos três estuários em estudo .....	56
<b>Tabela 9</b> – Média ( $\text{ngL}^{-1}$ ) e coeficiente de variação (%) sazonal para os valores de concentração dos três EDC's avaliados no estuário do rio Minho.....	57
<b>Tabela 10</b> - Média ( $\text{ngL}^{-1}$ ) e coeficiente de variação (%) sazonal para os valores de concentração dos três EDC's avaliados no estuário do rio Ave. ....	60
<b>Tabela 11</b> - Média ( $\text{ngL}^{-1}$ ) e coeficiente de variação (%) sazonal para os valores de concentração dos três EDC's avaliados no estuário do rio Mondego. ....	62

## Lista de Apêndices

---

**Apêndice 1** - Média e desvio-padrão dos parâmetros físico-químicos registados por estação do ano e ponto de amostragem no estuário do rio Minho (OD, oxigénio dissolvido).....81

**Apêndice 2** - Resultados da PERMANOVA para cada um dos parâmetros físico-químicos entre estações do ano (estação) e ponto de amostragem. Diferenças significativas em itálico. ....82

## Lista de Anexos

---

<b>Anexo 1:</b> Bacia Hidrográfica do rio Minho referente à parte portuguesa. Fonte: PHB, 2001 .....	84
<b>Anexo 2</b> - Ocupação do solo na área abrangida pela Bacia Hidrográfica do rio Minho. Fonte: SNIRH, 2014.....	84
<b>Anexo 3</b> - Zonas industriais existentes na área portuguesa abrangida pela Bacia Hidrográfica do rio Minho. Fonte: PHB, 2001.....	84
<b>Anexo 4</b> - Sistemas de saneamento propostos para a área portuguesa abrangida pela Bacia Hidrográfica do rio Minho. Fonte: PHB, 2001. ....	84
<b>Anexo 5</b> - Representação das zonas com risco de poluição situadas na parte portuguesa da Bacia Hidrográfica do rio Minho. Fonte: PHB, 2001. ....	84

## Lista de Acrónimos

---

**AP** - Alquilfenóis

**APA** - Agência Portuguesa do Ambiente

**Bio-A** - Biochanina

**BPA** - Bisfenol A

**CCE** - Comissão das Comunidades<sup>1</sup> Europeias

**Chrl** - Clorofila

**DAID** - Daidzeína

**E1** - Estrona

**E2** - 17- $\beta$  estradiol

**E3** - Estriol

**EC** - Emergent Compounds

**EDC** - Endocrine Disruptor Compounds

**EE2** - 17 $\alpha$ -etinilestradiol

**EIA** - Imunoensaio Enzimático

**ELISA** - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**ETAR** - Estações de Tratamento de Águas Residuais

**FE** - Fitoestrogénios

**GC** - Gas Chromatography

**GEN** - Genisteína

**HPLC** - High-Performance Liquid Chromatography

**INAG** - Instituto da Água

---

<sup>1</sup> Em inglês: *European Commission, EC*

**LC** - Liquid Chromatography

**MS** - Mass Spectrometry

**NNE** - Nor-nordeste

**NP** - Nonilfenol

**OD** - Oxigénio Dissolvido

**OMS** - Organização Mundial de Saúde

**OP** – Octilfenol

**pH** – Potencial de Hidrogénio

**SPE** - *Solid Phase Extraction*

**SSO** - Su-sudoeste

**USEPA** - *United States Environment Protection Agency*

**VTG** - Vitelogenina

**WHO** - *World Health Organization*

## Lista de Símbolos

---

**%** - percentagem

**µg** - micrograma

**cm** - centímetro

**g** - grama

**Km** - quilograma

**L** - litro

**m** - metro

**mg** - miligramas

**mL** - mililitro

**mm** – milímetro

**mS** - microSiemens

**µg** - micrograma

**ng** – nanogramas

**nm** - nanómetros

**nmol** – nanomoles

**°C** – graus centígrados

**V** – volume

# Capítulo 1 – Introdução Geral

---

## 1.1. Contextualização

A presença de compostos antropogénicos nos ecossistemas aquáticos induz alterações nas propriedades físicas e químicas da água afetando assim, a longo prazo, a qualidade de vida das espécies que dela são dependentes. Entre os diversos poluentes existem vários compostos xenobióticos. Estes, são substâncias químicas exógenas aos organismos vivos, de origem natural e/ou sintética. Os xenobióticos são designados por xenoestrogénios se mimetizam a ação dos estrogénios e anti-estrogénios e como tal interagem com o sistema endócrino. Uma vez introduzidos no ambiente e absorvidos pelos seres vivos, provocam alterações no normal funcionamento do sistema endócrino, pois afetam a produção, libertação e ação de hormonas naturais, ou seja, provocam disrupção endócrina. Por este motivo são conhecidos como Compostos Disruptores Endócrinos (EDCs).

Os diversos estudos desenvolvidos no âmbito da disrupção endócrina em meio aquático deram a conhecer exemplos de EDCs e alguns dos seus efeitos. De entre os resultados obtidos sabe-se que em diversos animais vertebrados e invertebrados estes compostos estão associados a caso de produção de vitelogenina (VTG) e feminização de machos, de masculinização de fêmeas (imposex), de “intersex” e de hermafroditismo. Os efeitos nefastos podem atingir inclusivamente o próprio Homem: no ser humano a presença de EDCs está associada à redução da produção de espermatozóides e conseqüente diminuição de fertilidade. Estes compostos, têm por isso preocupado e despertado a curiosidade da população em geral e da comunidade científica em particular. Contudo, a informação disponível sobre a situação em meio natural é ainda escassa.

É no âmbito da disrupção endócrina que o presente trabalho se desenvolve, sendo este parte integrante de um projeto, financiado pela FCT, intitulado INPACTAR – Efeitos a longo prazo da intersexualidade e outros impactos em populações de *Echinogammarus marinus* (PTDC/MAR/11537/2009). Neste projeto foram selecionados três estuários e nestes predefinidos três pontos de amostragem nos quais a abundância de *E. marinus* é conhecida e monitorizada. A associação deste trabalho ao projeto INPACTAR vem promover a futura correlação entre a dinâmica populacional e os níveis de intersexualidade nas populações de *E. marinus* e os níveis reais de EDCs observados nos estuários.

## **1.2. Importância do estudo**

A introdução em ambiente aquático de uma vasta gama de compostos químicos, que perturbam o natural desenvolvimento, crescimento e sobrevivência das espécies, é uma realidade que merece especial atenção e um conhecimento detalhado. De forma a auxiliar no desenvolvimento e implementação de medidas de monitorização, assim como na regularização dos níveis destes compostos químicos, o presente trabalho visa fornecer informações acerca da presença de EDCs no estuário do rio Minho, situado a Norte do território português. Na eventual presença destes compostos, os resultados obtidos poderão servir como referência futura.

Os EDCs englobam uma vasta gama de compostos que não só são promotores de poluição ambiental, como também são impulsionadores de efeitos nefastos nas espécies passíveis de estar em contacto (direto/indireto) com os mesmos.

Dos estudos realizados em território nacional e de acordo com a literatura científica, sabe-se que alguns estuários nacionais apresentam níveis consideráveis de EDCs, não só aqueles que serão referidos adiante mas também outros, tanto ou mais importantes, que aqui não são referidos. Alguns destes resultados serão referidos ao longo do trabalho não só como forma de divulgação dos mesmos, mas também como forma de referência comparativa com outros resultados.

Dado que a temática da disrupção endócrina é uma área de investigação emergente, a realização deste trabalho académico poderá apresentar-se como uma mais-valia futura, não só por tratar a identificação de EDCs, mas também por poder dar um contributo importante quanto a dados estatísticos referentes à sua presença no ambiente. A importância deste estudo foca-se também no facto de ser realizado no estuário do rio Minho, uma área de menor impacto de atividades antropogénicas relativamente a outros estuários nacionais que são hoje considerados como sendo poluídos.

### **1.2.1. Objetivo**

Atendendo ao âmbito no qual se insere este trabalho académico, bem como os requisitos de cientificidade subjacentes à sua realização, o presente estudo teve como objetivo principal a quantificação de Compostos Disruptores Endócrinos (EDCs) no estuário do rio Minho e comparação dos níveis detetados com os observados noutros estuários nacionais considerados “poluídos”, o Ave e Mondego.

Tendo em consideração as características do estuário, os objetivos gerais pretendidos para este trabalho e que justificam a realização do mesmo são:

1. Identificar a eventual presença de alguns EDCs, prioritários para este estudo, no estuário do rio Minho;
2. Verificar se existem flutuações sazonais nas concentrações, isto é, se em alguma época do ano os riscos associados à presença de EDCs são mais elevados;
3. Verificar se, ao longo do gradiente de salinidade, existem possíveis variações nas concentrações de EDCs.

Com a concretização dos objetivos apresentados, o presente estudo poderá servir de referência para estudos posteriores, quer em novos projetos nos mesmos estuários, quer em estuários e locais diferentes. Estes resultados poderão também servir de referência para auxiliar na monitorização, nomeadamente na implementação de medidas de prevenção quanto ao tratamento dos efluentes cujo destino final seja os ecossistemas aquáticos.

### **1.3. Organização da dissertação**

O presente trabalho teve como propósito de investigação a deteção de EDCs, isto é, compostos que afetam o normal funcionamento do sistema endócrino. A organização teórica neste contexto é apresentada em cinco capítulos que descrevem todo o trabalho desenvolvido.

Capítulo 1 – Introdução geral: pequena introdução ao tema de trabalho e apresentação dos objetivos esperados na execução desta dissertação.

Capítulo 2 – Enquadramento teórico: descrição dos principais conceitos enquadrados na temática da contaminação ambiental. Aqui, é dado um maior destaque à contaminação aquática e à descrição dos principais compostos disruptores endócrinos em estudo.

Capítulo 3 – Materiais e Métodos: descrição detalhada do estuário em estudo e apresentação dos estuários selecionados para a comparação, incluindo os pontos de amostragem e parâmetros físico-químicos analisados. Também é feita a apresentação das etapas do trabalho de campo e componente laboratorial, assim como descrição das metodologias adaptadas à execução dos objetivos deste projeto.

Capítulo 4 – Análise e discussão dos resultados: Apresentação dos resultados obtidos e análise dos mesmos. Discussão crítica geral dos resultados, seguindo os objetivos delineados para o presente estudo.

Capítulo 5 – Conclusão: Apresentação de perspectivas futuras.

## Capítulo 2 – Enquadramento teórico

---

### 2.1. Contaminação ambiental

As comunidades biológicas encontram-se em constante equilíbrio dinâmico no ecossistema onde se inserem. O número e tipo de espécies, o seu desenvolvimento e permanência nos diversos biomas são geridos consoante os recursos naturais disponíveis. A adaptação ao meio ambiente de forma autossustentável permite que os recursos naturais permaneçam, de certa forma, equilibrados estando o seu equilíbrio em causa quando os ecossistemas são sujeitos a fenómenos naturais como intempéries.

O Homem, ao contrário das diversas espécies, desenvolveu a capacidade de reunir de forma ativa os recursos necessários à sua subsistência. Com o crescimento exponencial das populações e com o aumento do consumo supérfluo extra-subsistência, a harmonia na natureza entre as diversas comunidades biológicas e das mesmas com o meio ambiente é afetada. O “equilíbrio ecológico” é então quebrado pelas exigências do ser humano, originando o desequilíbrio entre as comunidades biológicas e os ecossistemas, designado por “impacto ambiental”. Os impactos ambientais são então gerados quando ocorrem alterações nas condições físico-químicas e biológicas do meio ambiente decorrentes da ação humana. A Revolução Industrial foi sem dúvida o ponto de viragem no equilíbrio natural ambiental, pois proporcionou a quebra da relação entre o meio ambiente e o Homem. As sociedades de consumo desde então estimulam e promovem grandes mudanças nos ecossistemas do nosso planeta (Martins, 2004). Com o desenvolvimento das civilizações verificou-se a modificação das paisagens naturais, a contaminação da pureza do ar e, aos poucos, as margens dos ecossistemas aquáticos foram sendo ocupadas por campos agrícolas e vias de transporte, para além das estruturas erguidas para satisfazer as necessidades secundárias do ser humano.

Quando o satisfazer das necessidades humanas promove o esgotamento ambiental e os desequilíbrios criados afetam a qualidade de vida do Homem surge, então, a preocupação de manter o bom funcionamento dos ecossistemas, de forma a não se perder o nível de conforto atingido. Com esta realidade, urge a necessidade de implementar medidas de monitorização que promovam a proteção, conservação, recuperação e racionalização da utilização dos recursos naturais.

Nos últimos anos, vários foram os estudos e diversas as organizações governamentais que divulgaram o aumento da poluição e a consequente destruição dos ecossistemas (USEPA, 1997; WHO, 2002; Boxall, 2012). Dada a importância que os

diferentes ecossistemas apresentam, não só para biodiversidade, como também para a sobrevivência do ser humano, é urgente que se promova o conhecimento e se sensibilize a população para os efeitos nefastos da contaminação ambiental criada pelo próprio ser humano.

## **2.2. Contaminação dos ecossistemas aquáticos**

*“A água é o princípio de todas as coisas”*

Tales de Mileto

A água é um recurso natural limitado que, sendo um bem essencial para a sobrevivência das espécies, deve estar disponível: a sua quantidade e qualidade devem ser preservadas para bem das espécies que dela dependem. A água tem a capacidade de dissolver diversas substâncias que, num conjunto final, terão grande importância na composição química da mesma. A dissolução e a solubilidade de cada substância estão vinculadas aos parâmetros físico-químicos inerentes ao meio. A temperatura, a percentagem e concentração de oxigénio dissolvido, o pH e a salinidade do meio são alguns dos indicadores numéricos utilizados pelas entidades controladoras para aferir a tipologia e qualidade da água de determinado meio.

Os ecossistemas aquáticos, que abrangem ecossistemas de água doce (rios, ribeiras, estuários, lagos e lagoas), incluindo as águas subterrâneas, e ecossistemas marinhos (oceanos e mares), são amplamente utilizados pelo ser humano e em muitos dos casos de forma excessiva, não havendo uma perceção dos desequilíbrios que esta utilização pode causar a longo prazo. Estes ecossistemas são o destino final para muitas das substâncias (naturais ou sintéticas) de origem antropogénica.

Os estuários são ecossistemas complexos e dinâmicos, de grande variação temporal e espacial, que englobam diferentes habitats permitindo a coexistência de diversos habitats (Meire *et al.*, 2005). Podem ser classificados segundo a sua topografia, morfologia, estrutura e estratificação salina (Little, 2000). Embora não exista uma definição universal do termo, uma das definições mais simples é apresentada por Pritchard no ano de 1967 (Pritchard, 1967), onde o autor definiu um ecossistema estuarino como sendo: *“um corpo de água semifechado que tem uma conexão livre com o mar, dentro do qual a massa de água de origem marinha se dilui de forma mensurável*

com a água doce proveniente da drenagem continental". Embora mais simples, esta definição, apresenta algumas limitações e não engloba o conceito como um todo uma vez que exclui diversos estuários, nomeadamente os estuários hipersalinos e aqueles que ficam separados das zonas marinhas em épocas de seca (Lyra, 2007). Muitos são os autores que ao longo do tempo contribuíram para a definição do conceito de estuário. De forma mais resumida e comumente utilizada, o ambiente estuarino pode ser definido como sendo um corpo de água costeiro, semifechado e geomorfologicamente dinâmico, que engloba uma transição entre o rio e o mar, na qual a água salgada se dilui com a água doce por intermédio da dinâmica existente no local. Abrange uma grande quantidade de comunidades biológicas, cuja diversidade se deve, em parte, às variações de salinidade, movimentos de água e turbidez, que provocam *stress* (fisiológico e físico) nas espécies. É considerado como sendo dos biomas mais produtivos, e sustém importantes funções dos ecossistemas, nomeadamente os ciclos biogeoquímicos, o fluxo de nutrientes, a manutenção da produtividade e a produção biológica, assim como a mitigação de inundações (Hibma *et al.*, 2004; Meire *et al.*, 2005; Maia-Mendes, 2007; Sousa *et al.*, 2008; Costa-Dias *et al.*, 2010a).

Embora estes ecossistemas sejam de extrema importância, a pressão antrópica sobre eles exercida tem incrementado ao longo dos últimos anos (Costa-Dias *et al.*, 2010b). Na evolução das civilizações, a facilidade de transporte e a necessidade de obter alimento, nas condições então favorecidas, possibilitou a criação e o desenvolvimento de atividades agrícolas e piscícolas e, posteriormente, e em forma de consequência, a criação do comércio e da indústria. Com as facilidades de acesso, é notável, até aos dias de hoje, o elevado nível de ocupação antrópica, havendo como agravante a contínua degradação dos ecossistemas envolventes.

A poluição das águas é um problema ambiental global e não atual. Desde os primórdios da existência humana, diversas foram as atividades antrópicas que contribuíram para a degradação ambiental. Na sua evolução, a exploração mineira e a revolução industrial foram dois marcos importantes para a sua indução, tendo em conta que os primeiros relatos de poluição provêm da presença dos produtos resultantes destas atividades (Martins, 2004; Plant *et al.*, 2005; Burkhardt-Holm, 2010). A poluição das águas muitas das vezes provêm do escoamento dos rios que podem ser afetados por descargas de esgotos industriais, hospitalares e domésticos e escoamento de solos agrícolas.

Hoje, o ser humano depara-se com a necessidade de estudar o impacto que as suas ações promoveram sobre os ecossistemas, de modo a promover a descoberta,

monitorização e recuperação dos ecossistemas e habitats afetados pelas exigências que o próprio Homem lhe impõe.

## 2.3. Contaminantes ambientais

O desenvolvimento industrial e agrícola, associado ao excessivo consumismo, conduziu à falta de saúde ambiental atual dos ecossistemas. Muitas das substâncias ou compostos que hoje surgem nos ecossistemas naturais resultam da melhoria da qualidade de vida por parte do ser humano ao longo do seu processo de adaptação. Para além da já conhecida utilização dos metais pesados e plásticos pelo Homem (pós revolução industrial), a contínua utilização dos mais diversos compostos químicos desenvolvidos pelo Homem (tintas, fármacos, produtos de limpeza, entre outros) levou ao agravamento dos níveis de poluição. Levou igualmente a que os mesmos se acumulassem e persistissem no ambiente, arrecadando efeitos nefastos não só para o ambiente envolvente, como também para a sobrevivência da biodiversidade natural e qualidade da saúde do ser humano.

### 2.3.1. Compostos Disruptores Endócrinos, EDCs

Os Compostos Disruptores Endócrinos, designados na literatura anglo-saxónica por *Endocrine Disruptors Compounds*, acrónimo EDCs, são definidos, no geral, como sendo compostos que, uma vez presentes no ambiente, podem desencadear alterações no correto funcionamento do sistema endócrino dos organismos vivos. Não havendo uma definição universal, são várias as definições adaptadas, pelos diversos autores e organizações governamentais, para a elucidação do conceito de EDC. Na continuidade do presente trabalho são apresentadas três definições acordadas por três importantes organizações mundiais – a *Environmental Protection Agency (EPA)*<sup>2</sup>, a *World Health Organization (WHO)*<sup>3</sup> e a *European Commission (EC)*<sup>4</sup>.

*“An exogenous agent that interferes with the synthesis, secretion, transport, binding, action, or elimination of natural hormones in the body that is responsible for the maintenance of homeostasis, reproduction, development, and/or behavior” (USEPA, 1997).*

---

<sup>2</sup> Em Portugal: Agência Portuguesa do Ambiente (APA)

<sup>3</sup> Em Portugal: Organização Mundial de Saúde (OMS)

<sup>4</sup> Em Portugal: Comunidades Europeias (CE)

*“An endocrine disruptor is an exogenous substance or mixture that alters function(s) of the endocrine system and consequently causes adverse health effects in an intact organism, or its progeny, or (sub) populations”* (WHO, 2002; EC, 1999; CCE, 2001).

*“An potential endocrine disruptor is an exogenous substance or mixture that possesses properties that might be expected to lead to endocrine disruption in an intact organism, or its progeny, or (sub) populations”* (WHO, 2002; EC, 1999; CCE, 2001).

No que concerne à definição proposta e utilizada pela EC, um determinado composto é considerado um EDC se obedecer a determinados critérios de avaliação. Assim, para que um composto seja considerado um EDC é necessário que o próprio desenvolva no organismo-alvo um efeito adverso e provoque a disrupção endócrina. Por sua vez, definir o composto como um EDC implica a existência de uma *“prova de causalidade”* entre o efeito adverso observado e a desregulação endócrina manifestada (Kortenkamp *et al.*, 2011). Segundo Bergman e colaboradores<sup>5</sup> (2012), um composto químico não pode ser considerado um disruptor endócrino apenas por análise da sua estrutura química, uma vez que inerente ao composto estão várias características e infinitos mecanismos de ação que poderão ou não desencadear o efeito. Em muitos dos casos, o efeito disruptor endócrino pode ser consequência da ação de metabolitos primários e/ou secundários, provenientes da metabolização do composto principal (Bergman *et al.*, 2012).

No geral, os EDCs são compostos ubíquos, heterogêneos, que em alguns dos casos podem apresentar persistência a baixas temperaturas. Quimicamente apresentam características estruturais distintas, onde é comum a presença de um ou mais anéis aromáticos na estrutura química (Burkhardt-Holm, 2010). As diferentes propriedades físico-químicas inerentes a cada composto desencadeiam comportamentos distintos.

De forma a facilitar a identificação destes compostos, no ano 2000, a Comissão das Comunidades Europeias elaborou uma lista de 564 potenciais EDCs sendo a mesma retificada dois anos mais tarde e resumida para cerca de 435 compostos, seguindo como prioridade de seleção, a capacidade que estes compostos apresentam para desenvolverem atividade disruptora endócrina (CCE, 2001). Segundo Belgiorno e colaboradores (2007) e o disposto na Diretiva Quadro da Água (DQA), as substâncias são avaliadas como sendo prioritárias atendendo a sua toxicidade, persistência ambiental

---

<sup>5</sup> Avaliação de estado da ciência acerca dos compostos disruptores endócrinos. *“State of the science of endocrine disrupting chemicals”* é um dos artigos mais recentes elaborado no ano de 2012 cujos autores fazem parte das Nações Unidas e da Organização Mundial de Saúde (Bergman *et al.*, 2012).

e afinidade com substâncias lipofílicas uma vez que são estas as características que as conduzem à bioacumulação nas cadeias alimentares.

Dentro do grupo dos EDCs, é de salientar ainda o conceito de “composto emergente”, do inglês “*Emergent Compound, EC*” pois, por vezes, muitos dos compostos que são abrangidos pelos EDCs são assim denominados. O conceito de “composto emergente” não apresenta, na atualidade, um registo de definição universal no entanto, engloba, de uma forma geral, qualquer produto químico (natural e/ou sintético) que, não sendo comumente monitorizado, tem o potencial de entrar no ambiente e desencadear efeitos nefastos não só nos biomas onde se insere, como também nas comunidades biológicas que nele habitam (Snow, 2009; Boxall, 2012; USEPA, 2012).

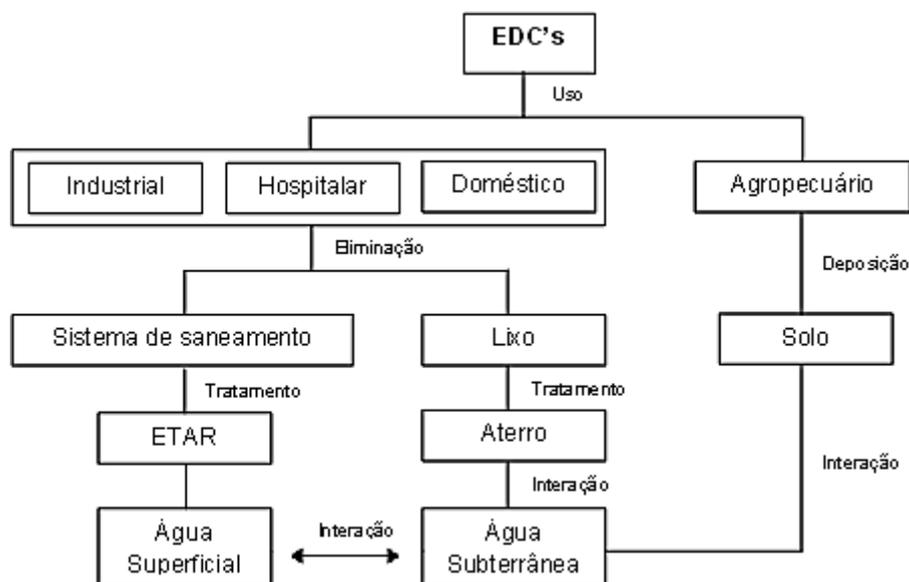
Os compostos que constituem este grupo merecem uma especial atenção no que concerne às consequências que advêm da sua presença nos mais diversos ambientes naturais. A facilidade de entrada destes compostos no ambiente, assim como os eventuais efeitos adversos que causam quer nas espécies expostas, quer nos ecossistemas, tem despertado a atenção dos investigadores, incentivando-os na execução de estudos cujo objetivo principal seja a identificação destes compostos, a avaliação do seu destino, dos seus efeitos e a sua monitorização.

### **2.3.1.1. Fontes de contaminação**

Na atualidade, a quantidade de poluentes introduzidos nos ecossistemas é cada vez mais extensa, contínua e preocupante (Cargouet *et al.*, 2004). No que concerne aos ecossistemas aquáticos, os EDCs são facilmente introduzidos no ambiente aquático por diversas fontes de contaminação que se podem classificar como sendo pontuais ou difusas. Do setor industrial à agricultura, agrupando os efluentes hospitalares e domésticos, são várias as vias de entrada a partir das quais ocorre contaminação e modificação dos ecossistemas aquáticos.

Na Figura 1 destacam-se os efluentes (domésticos, industriais e hospitalares) e a agropecuária como possíveis vias de entrada de EDCs em ambientes aquáticos (Richardson e Bowron, 1985; Heberer, 2002; Lubick, 2010). No setor industrial, hospitalar e doméstico são diariamente acumulados diversos resíduos. A entrada destes compostos para o ambiente não é feita apenas no momento da sua eliminação, mas em muitos dos casos a sua acumulação é feita durante a produção e a utilização (Bergman *et al.*, 2012). Para além destas fontes, o escoamento proveniente de terrenos agrícolas é também uma fonte de poluição aquática. Não só os produtos químicos utilizados para a fertilização dos

solos mas também as hormonas libertadas pelos animais são depositados no solo, sendo depois lixiviados para ecossistemas aquáticos próximos.



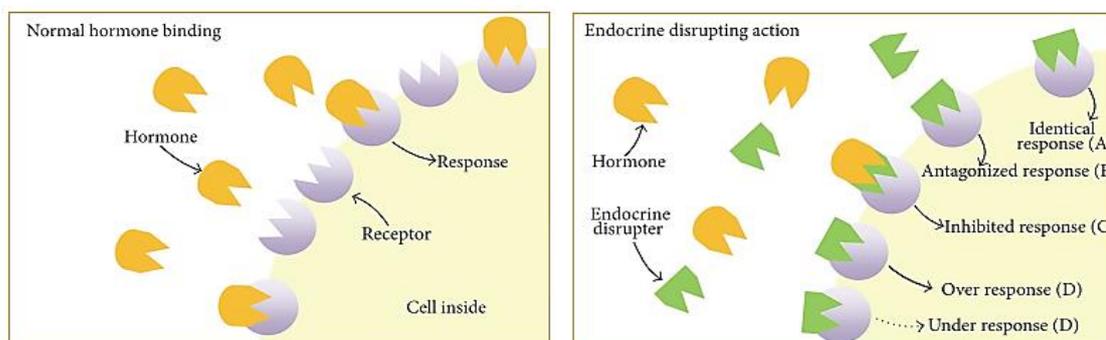
**Figura 1** - Esquema representativo de eventuais vias de dispersão de EDCs no ambiente.

Tendo em conta as diversas fontes de dispersão, através das quais os EDCs são adicionados aos ecossistemas, surge a necessidade de criar metas de monitorização ambiental de forma a prevenir a contínua contaminação dos ecossistemas que põe em perigo as espécies que desses ecossistemas fazem parte.

### 2.3.1.2. Mecanismos de ação

Os EDCs apresentam diversos efeitos sobre os organismos. No geral, interferem com a síntese, secreção, transporte, ligação, ação e eliminação das hormonas naturais, afetando síntese e os níveis dos recetores hormonais e consequentemente interagem com o sistema endócrino (Lintelmann *et al.*, 2003; Markey *et al.*, 2003; Porte *et al.*, 2006; Sousa, 2009; Caliman e Gavrilescu, 2009; Lemos, 2009). De acordo com as propriedades inerentes a cada composto, a ação a desenvolver será direcionada para um alvo específico, sendo que, mimetizar e bloquear a ação das hormonas naturais são duas das formas mais comuns pelas quais os EDCs interferem com o normal funcionamento do sistema endócrino. Adaptando os efeitos no organismo ao tipo de EDC que os desencadeiam, estes podem assim ser considerados agonistas, antagonistas, inibidores enzimáticos e/ou destruidores hormonais dependendo do modo como atuam. A Figura 2 ilustra duas situações distintas nas quais é evidenciada a situação normal (à esquerda) e

as ações promovidas pelos EDCs, aquando do contato dos mesmos com o organismo (à direita). Salientar que, as ações evidenciadas são ilustrações hipotéticas das várias consequências que um EDC, ou conjunto deles, pode ter sob o sistema endócrino.



**Figura 2** - Mecanismos de ação dos EDCs. (A) Efeito agonista; (B) Efeito antagonista; (C) Alteração do padrão de síntese e metabolismo; (D) Modificação na expressão dos receptores hormonais. Adaptado de Sosa-Ferrera *et al.*, 2013.

Numa situação dita normal, as ligações entre as hormonas e respetivos receptores hormonais são desencadeadas normalmente. Aquando da exposição do organismo aos mais diversos EDCs, são desencadeadas diversas alterações sobre o sistema endócrino. Numa situação em que o EDC mimetiza a ação das hormonas (efeito agonista), este liga-se ao recetor hormonal de forma precisa e são desencadeadas reações químicas semelhantes às desencadeadas pela hormona natural. O efeito adverso desencadeado no organismo varia de acordo com o tipo hormona que está a ser substituída pelo EDC. Numa situação contrária, efeito antagonista, a ligação do EDC ao recetor hormonal bloqueia o recetor, bloqueando por sua vez a ligação das hormonas naturais. Esta ligação desencadeia uma resposta hormonal que pode aumentar ou diminuir o estímulo causado. Considerando o efeito agonista e antagonista como sendo os mais evidenciados pelos EDCs, não podemos descuidar a ação dos inibidores enzimáticos, que afetam diretamente as enzimas que metabolizam as hormonas naturais, e os EDCs que destroem as hormonas naturais, podendo alterar a estrutura ou influenciar no ritmo de síntese (Campos, 2011 e Sosa-Ferrera *et al.*, 2013).

Resumidamente e adaptando o termo à ação que cada composto desempenha, é de notar que todos irão afetar, direta ou indiretamente, o correto desenvolvimento do sistema endócrino, pois os EDCs têm a capacidade de mimetizar o papel das hormonas naturais no organismo (Helland, 2006; Caliman e Gavrilescu, 2009). Assim sendo, cada composto pode afetar os organismos por diversas vias, o que por sua vez pode promover os seguintes efeitos no organismo:

- ❖ Alterações na produção, libertação e distribuição das hormonas;
- ❖ Estimulação/antagonização da ação hormonal no organismo;
- ❖ Alterações no padrão de síntese e metabolismo das hormonas;
- ❖ Modificação nos níveis de recetores hormonais;
- ❖ Bloqueio e alterações nas ligações hormonais com os respetivos recetores que, consequentemente afetam a ação dos recetores.

Na atualidade, existe um grande interesse no estudo científico destes compostos não só para caracterizar o seu impacto no ambiente como também eventuais efeitos adversos para as comunidades biológicas presentes nos mais diversos ecossistemas. Paralelamente com esta preocupação, surge uma preocupação acrescida que relaciona a ação perturbadora destes compostos e o sistema endócrino.

### 2.3.2. Caracterização geral dos EDCs em estudo

Diversos são os compostos categorizados como EDCs. No entanto, e não desprezando a importância que todos apresentam, apenas alguns serão abordados neste trabalho uma vez que seria inviável particularizar cada um. Atendendo ao propósito deste estudo, o grupo de compostos com interesse prioritário são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Grupo de EDCs analisados no presente estudo.

Grupo EDCs	Exemplo	Acrónimo
Hormonas naturais	Estrona	E1
	17- $\beta$ Estradiol	E2
Hormonas sintéticas	17 $\alpha$ -Ethinilestradiol	EE2
Fenóis	Bisfenol-A	BPA

De acordo com os objetivos delineados para este trabalho, é necessário ter presente algumas das características dos EDCs em estudo. O prévio conhecimento destes novos compostos, antes da sua análise, é de extrema importância para que seja possível uma correta interpretação dos resultados. Embora se enquadrem no mesmo conjunto, cada um dos compostos apresenta características específicas.

Os reguladores hormonais, muito utilizados pela crescente população, surgem no ambiente aquático maioritariamente por ação antrópica (Caliman e Gavrilescu, 2009; Mompelat *et al.*, 2009). Estes podem ser de origem natural ou sintética e são sintetizados

com o objetivo de desempenhar uma função específica no organismo. Dentro do grupo das hormonas estrogénicas, destacam-se a estrona (E1), o estradiol (E2) e o estriol (E3), este último não incluído nos compostos com interesse prioritário para este estudo. Estes são compostos hormonais lipofílicos, produzidos de forma natural pelo sistema endócrino e são responsáveis pelo correto desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários e regulação da reprodução entre outras inúmeras funções fisiológicas. A E1 é o principal estrogénio a ser libertado pela mulher após a menopausa e biologicamente é menos ativo quando comparada com os restantes. O E2 é o estrogénio mais ativo e com grande importância para a mulher em idade reprodutiva. O E3 é sintetizado em grandes quantidades durante a gravidez e apresenta um potencial disruptor inferior quando comparado com E1 e E2 (Carvalho, 2012). Os compostos estrogénicos no geral, evidenciam um potencial disruptor maior (Noppe *et al.*, 2005; Fenlon *et al.*, 2010) relativamente aos restantes compostos pertencentes à lista de EDCs. A excreção destes compostos é maioritariamente feita pela urina, sob a forma de conjugados inativos e polares (nomeadamente glicuronídeos e/ou sulfatos), solúveis em água, que em condições experimentais podem ser hidrolisados (Noppe *et al.*, 2005). Os níveis de excreção são variáveis consoante a idade, sexo, estado de saúde, dieta e gravidez<sup>6</sup>. Depois de serem excretados, estes compostos podem entrar diretamente nos ecossistemas aquáticos. Esta é uma das maiores preocupações a nível mundial uma vez que a presença destes compostos está muitas vezes associada à falta de monitorização de esgotos ou ineficácia de tratamento nas Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs). De facto, estas são consideradas importantes focos de dispersão de EDCs (Filby *et al.*, 2007).

O bisfenol A (BPA) é um composto orgânico pertencente ao grupo dos derivados de difenilmetanos. A caracterização deste composto, nomeadamente as propriedades físico-químicas, e a presença no ambiente é bem detalhada por Cousins e colaboradores, (2002). Conhecido como sendo um poluente industrial emergente nos ecossistemas aquáticos, a sua utilização está preferencialmente associada à produção de plásticos. É também utilizado como um intermediário na produção de polímeros, resinas epóxi, policarbonatos, fungicidas, antioxidantes. Os corantes e algumas resinas, assim como retardadores de chama, produtos químicos de borracha e revestimento interno de enlatados integram também esta classe de compostos (Lintelmann *et al.*, 2003). É por isso um composto de uso generalizado na indústria. Está maioritariamente associado a esgotos industriais e urbanos e a sua degradação, após tratamento nas ETARs, não é

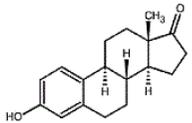
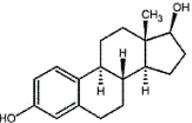
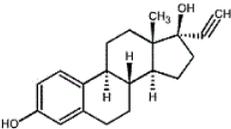
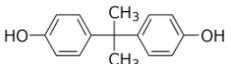
---

<sup>6</sup> Por curiosidade, e de acordo com os resultados apresentados no estudo de Lintelmann e colaboradores (Lintelmann *et al.*, 2003), a quantidade de estrogénios libertada por uma mulher grávida, dependendo do estágio de gravidez, é cerca de mil vezes superior comparativamente com a quantidade libertada por uma mulher em atividade normal.

completa, e sim na ordem dos 37% a 94% (Bergman *et al.*, 2012). Este composto tem sido detetado em diversos ecossistemas aquáticos nacionais e internacionais.

Devido à grande variedade de propriedades físico-químicas que estes compostos apresentam, na Tabela 2 são sumariadas algumas dessas propriedades, sendo que, a escolha das mesmas está relacionada com a sua bioacumulação, biomagnificação e a persistência em ambiente aquático.

**Tabela 2** - Propriedades físico-químicas e fontes de dispersão dos EDCs em estudo.

EDCs	Abrev.	Estrutura química	Fórmula	Peso molecular (g/mol) <sup>a</sup>	Y <sub>sat</sub> (µg/l)	Log k <sub>ow</sub>	Fontes de dispersão
Estrona	E1		C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	270	12420 <sup>b</sup>	3.1 -3.4 <sup>c</sup>	Efluentes urbanos e municipais
17β-estradiol	E2		C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	272	12960 <sup>b</sup>	3.8-4.0 <sup>c</sup>	Efluentes urbanos e municipais
17α-etinilestradiol	EE2		C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	296	483	3.67-4.2 <sup>d</sup>	Efluentes municipais
Bisfenol-A	BPA		C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	228	120000-300000 <sup>e</sup>	3.40 <sup>b</sup>	Efluentes industriais

<sup>a</sup> Ribeiro *et al.*, 2007 ; <sup>b</sup> Cousins *et al.*, 2002 ; <sup>c</sup> Khanal *et al.*, 2006; <sup>d</sup> Nagpa e Meays, 2009 ; <sup>e</sup> Borriukwisitsak *et al.*, 2012;

Y<sub>sat</sub>: solubilidade em água a 25°C;

Log k<sub>ow</sub>: coeficiente de partição octanol/água;

## 2.4. Organismos *versus* Disrupção endócrina

O sistema endócrino, cujo termo provém do significado grego *endos* - dentro e *krynos* – secreção, desempenha um papel crucial para o correto desenvolvimento dos organismos. A proliferação e a diferenciação celular, o desenvolvimento dos diversos órgãos, assim como processos nutricionais, comportamentais e reprodutivos, funções cardiovasculares, hepáticas e renais, entre outras, estão intrinsecamente relacionados com o sistema endócrino (WHO, 2002; Lintelmann *et al.*, 2003). Este por sua vez é constituído por um conjunto complexo de diversas glândulas que produzem e armazenam várias hormonas.

As hormonas são substâncias com função sinalizadora que interagem com recetores endógenos específicos (Nogueira, 1999). Funcionam como “mensageiros químicos” controlando muitas das funções vitais inerentes a cada etapa de desenvolvimento. A libertação das mesmas para o fluxo sanguíneo é feita de forma controlada e com base nas necessidades do organismo, sendo que a concentração libertada, a partir da qual se desencadeia o efeito no interior do organismo, é em doses extremamente baixas (na gama dos pico aos nanogramas) (Vandenberg *et al.*, 2012). A produção e libertação de hormonas são de uma importância vital para o correto desenvolvimento dos organismos, uma vez que regulam uma das mais importantes etapas do desenvolvimento de um organismo, o desenvolvimento embrionário, para além do correto desenvolvimento geral, do comportamento, da manutenção da homeostasia dos organismos e da reprodução (Caliman e Gavrilescu, 2009; Sousa, 2009). A produção hormonal não é exclusiva da espécie humana, está também presente noutros animais e em espécies vegetais (Henriques, 2008). De acordo com cada espécie, poderá haver diferenças quanto à organização do sistema endócrino; no entanto, a caracterização estrutural hormonal geral é convergente entre espécies. Nos vertebrados, por exemplo, existem muitas semelhanças entre as características estruturais e funcionais das hormonas o que, não acontece em espécies vegetais onde as hormonas naturais apresentam diferenças na caracterização hormonal. Contudo, o mecanismo de ação inerente a estas é semelhante ao que decorre nos vertebrados.

Os estrogénios, progestagénios e androgénios, vulgarmente designados por esteróides sexuais, são exemplos de hormonas naturais sintetizadas ao longo do ciclo de vida do ser humano, apresentando numerosas funções fisiológicas. Embora estas hormonas sejam fundamentais para o ser humano, elas enquadram-se na classe de substâncias com atividade passível de disrupção endócrina (Silva, 2011a), isto é, podem

interagir indiretamente com o sistema endócrino, tendo como efeito posterior a libertação de quantidades excessivas ou supressão da produção de hormonas naturais (Caliman e Gavrilescu, 2009). De forma a controlar desregulações hormonais, que muitas das vezes ocorrem por sucessivos *feedbacks* positivos e negativos, existem compostos farmacêuticos de origem sintética que funcionam como hormonas naturais. Estas hormonas sintéticas, designadas por “xenoestrogénios”, são moléculas complexas, com diferentes propriedades, biologicamente ativas (Kummerer, 2009) cujo principal objetivo de produção e utilização se baseia na correção médica de défices hormonais. Para além das hormonas naturais e sintéticas existem também outros compostos, maioritariamente para uso humano, que apresentam atividade disruptora endócrina (p.e. pesticidas, inseticidas, fármacos, tintas, produtos industriais, entre outros).

Nos últimos 60 anos, diversos ecologistas, ambientalistas, toxicologistas e endocrinologistas divulgaram os potenciais efeitos que determinados compostos químicos têm sobre os seres vivos assim como sobre a integridade dos ecossistemas. Para a avaliação global dos ecossistemas para além dos níveis de contaminação do meio e dos grupos de espécies que o coloniza, é essencial um prévio conhecimento das comunidades biológicas presentes nos ecossistemas aquáticos, em particular das espécies predominantes. Para abordar a questão dos EDCs e associar os mesmos à contaminação dos ecossistemas e aos efeitos sob as diferentes espécies aquáticas é necessário elucidar aspetos essenciais decorrentes da disrupção. Do sistema endócrino à disrupção endócrina, agrupando as substâncias detetadas e espécies mais afetadas nos estudos realizados, no decorrer deste trabalho académico é feita uma análise bibliográfica dos estudos realizados.

#### **2.4.1. Disrupção endócrina por EDCs em meio aquático**

Coincidência ou não, após a 2ª Guerra Mundial verificou-se um aumento, em número e volume, na utilização de diversos compostos que, na atualidade, são considerados como disruptores endócrinos. Segundo a literatura, não há evidências que comprovem a presença destes compostos nas décadas anteriores a 1950 (Colborn *et al.*, 1993). Numa publicação de Henriques (2010), é descrito que no ano de 1950 se denotou o primeiro caso publicado associado à disrupção endócrina, relacionado com a mudança de algumas espécies faunísticas dos grandes lagos do Canadá. Em 1962 Rachel Carson publica um dos primeiros estudos na área da disrupção endócrina intitulado “*Silent Spring*” e trinta anos mais tarde, em 1996, surge a publicação do livro “*Stolen Future: Are we threatening our fertility, intelligence and survival?*”, escrito por Theo Colborn, Dianne Dumanoski e Jonh Peterson Myers, que desperta a atenção do público em geral. Desde

então, foi crescente a divulgação de estudos, e seus resultados, na área da disrupção endócrina.

#### 2.4.1.1. Estudos Internacionais

Nas últimas décadas, distintos trabalhos científicos dedicaram-se ao estudo das propriedades de diversos compostos com efeitos ao nível hormonal, histológico, imunológico e/ou neurológico. Embora seja amplo o historial literário dos estudos realizados, é cada vez mais comum o desenvolvimento de estudos que visem o aumento da informação científica acerca destes compostos. Contudo, a literatura científica focada na disrupção endócrina converge na relação entre EDCs e os seus efeitos nos seres vivos. Podendo afetar o próprio ser humano, para além de outras espécies animais invertebrados e/ou vertebrados, os efeitos resultantes da ação dos EDCs cientificamente identificados são variados (Clotfelter *et al.*, 2004). De entre todos os efeitos reportados pela comunidade científica, salientam-se para o presente estudo a redução da fertilidade, feminização dos machos, produção de vitelogenina (VTG) em machos, hermafroditismo, “imposex” e “intersex” em fêmeas (Barroso *et al.*, 2002, Colborn *et al.*, 1993; Gray *et al.*, 1997; Jobling *et al.*, 1998; Jobling *et al.*, 2002; Segner *et al.*, 2003; Sumpter, 1998; Sumpter e Jobling, 1995; Vethaak *et al.*, 2005; Woodling *et al.*, 2006). Estes efeitos e suas consequências são variáveis em mecanismo de ação e em intensidade consoante a espécie. Os efeitos que advêm da presença dos EDCs no ambiente não dependem apenas da concentração no meio mas também de características associadas aos mesmos como a facilidade de se misturar com gorduras, a persistência, bioacumulação, tempo de exposição, mecanismos de biotransformação entre outros (Carvalho, 2012).

Em estudos de revisão de literatura, são apresentados diversos efeitos como consequência da exposição aos EDCs analisados no presente trabalho, embora para estes casos concretos não haja descrição dos níveis de cada EDC detetados quer nos organismos estudados, quer no meio de onde provêm. Muitos dos artigos focam dois géneros de estudo: (1) deteção e/ou quantificação de EDCs em ecossistemas aquáticos e (2) estudo de espécies no sentido de verificar alterações no desenvolvimento, crescimento e reprodução quando expostas a EDCs. Shore e colaboradores (1993) foram dos primeiros investigadores a estudar a influência das hormonas naturais como poluentes ambientais. Kime (1999) desenvolveu um dos trabalhos mais minuciosos relativamente aos estudos laboratoriais dos quais se avaliou os efeitos de EDCs em peixes, e que resultou na publicação do livro “*A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction*”. Sumpter e Jobling (1995) realizaram diversos estudos laboratoriais *in vivo*, utilizando truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*, nos quais

comprovaram a ação gerada pelos metabolitos de alquilfenóis no que concerne a indução da produção de VTG. O mesmo se veio a verificar em trabalhos seguintes do mesmo autor e outros (Hemmer *et al.*, 2001; Jobling *et al.*, 1998). White e colegas (1994) demonstraram, utilizando culturas de células, que os alquilfenóis apresentam um efeito estrogénico em espécies de peixes, aves e no próprio ser humano, assim como mimetiza os efeitos do 17 $\beta$ -estradiol (E2) por ligação ao seu recetor. Jobling e colaboradores (1998) verificaram que a intersexualidade evidenciada em *Rutilus rutilus* nos rios do Reino Unido, está associada à exposição da espécie a água proveniente de ETARs. Larson e colaboradores (1999) constataram que a elevada estrogenicidade evidenciada nas ETARs da Suécia Oriental pode estar relacionada com o aparecimento de hermafroditas de truta arco-íris juvenis e a elevada indução na produção de VTG nos machos. Segner e colaboradores (2003) descrevem também diversas alterações no desenvolvimento e reprodução na espécie *Danio rerio*, assim como em invertebrados, resultantes da exposição a BPA e EE2.

Para as hormonas naturais, nomeadamente 17 $\beta$ -estradiol (E2) e estriol (E3), a feminização de machos, a alteração no tamanho das gónadas e a elevada mortalidade da descendência são os efeitos mais evidenciados em peixes (Bila e Dezotti, 2007; Mills e Chichester, 2005). Na classe dos alquilfenóis, nomeadamente octilfenol (4-OP) e nonilfenol (4-NP), são detetados os mesmos efeitos, evidenciando-se também o declínio na reprodução e indução da produção de VTG (Bila e Dezotti, 2007). O efeito destes compostos é também evidenciado em crustáceos com o declínio da reprodução e intersexualidade em várias espécies (Oehlmann e Oehlmann, 2003).

Mesmo que incompleto, o conhecimento sobre as consequências da exposição a EDCs é vasto. Como seria inviável apresentar e descrever todos os efeitos evidenciados até ao momento, na Tabela 3 são apresentados mais alguns estudos internacionais nos quais, para além do efeito causado, é apresentada a concentração de EDCs para a qual se regista o efeito. Nestes estudos, uma dada espécie é submetida a uma determinada concentração de um composto considerado EDC, a fim de verificar a indução de um determinado efeito. Na Tabela 4 são apresentados alguns dos trabalhos internacionais publicados nos quais foi registada a presença de EDCs em meio aquático. É de salientar que, no geral, são mais os estudos internacionais realizados comparativamente com o panorama nacional publicado.

**Tabela 3** - Estudos internacionais, em espécies aquáticas, nos quais foi detetada a presença dos EDCs em estudo ( $\text{ngL}^{-1}$ ) assim como os efeitos associados às concentrações evidenciadas.

EDC	Efeitos	Taxon	Níveis detetados <sup>7</sup>	Referência
<b>Estrona (E1)</b>	Indução da produção de VTG	Moluscos	100 - $1,0 \times 10^8$	
<b><u>17<math>\beta</math>-estradiol (E2)</u></b>	Redução do crescimento	Crustáceos	$< 1,0 \times 10^4$	Oehlmann e Oehlmann, 2003
<b>17<math>\alpha</math>-etinilestradiol (EE2)</b>	Feminização de machos	<i>Danio rerio</i>	250	Nagpal e Meays, 2009
	Aumento da mortalidade por toxicidade		$< 500$	Van den Belt e Witters, 2001
<b>Bisfenol-A (BPA)</b>	Indução da produção de VTG	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	0,2 – 1,7	Sumpter e Jobling, 1995
	Inibição da produção de ovos	<i>Pimphales promelas</i>	$1,28 \times 10^6$	Sohoni <i>et al.</i> , 2001
	Diminuição do peso e crescimento de machos		$6,4 \times 10^5 - 1,28 \times 10^6$	

<sup>7</sup> Níveis de EDCs administrados na espécie em estudo. Salientar que para alguns valores, os autores fazem uma estimativa do intervalo de variação das concentrações utilizadas.

**Tabela 4** - Estudos realizados em diversos estuários internacionais nos quais foi detetada a presença dos EDC's em estudo.

Referência	EDC	Ecossistema aquático	Observações
Shore <i>et al.</i> , 1993	<b>Estrogénios</b>	Lago Kinneret e água para consumo humano e regadios (Israel)	- 0,08-0,09 nmolL <sup>-1</sup> na água do lago; - 0,05-0,08 nmolL <sup>-1</sup> na água utilizada para consumo humano <sup>8</sup> e regadio dos cultivos.
Atkinson <i>et al.</i> , 2003	<b>Estrogénios</b>	Baía de Kāneʻohe, ilha Coconut e efluente (ilhas Hawai)	Concentrações médias de estrogénios: - 0,5 ngL <sup>-1</sup> , 68 ngL <sup>-1</sup> ; - 20 ngL <sup>-1</sup> (segundo a ordem de ecossistemas).
Cargouet <i>et al.</i> , 2004	<b>Estrogénios</b>	ETARs e Rio Sena (Paris)	- 2,7-17,6 ngL <sup>-1</sup> nas ETARs; - 1,0 a 3,2 ngL <sup>-1</sup> no rio Sena; - Maior concentração de E1 (4,3 a 17,6 ngL <sup>-1</sup> ) e E3 (5,0-15,2 ngL <sup>-1</sup> ) nas ETARs; - Maior concentração de E2 (1,4-3,2 ngL <sup>-1</sup> ) nas águas de superfície <sup>9</sup> .
Céspedes <i>et al.</i> , 2005	<b>Bisfenol-A</b>	Rio Llobregat (Catalunha, Espanha)	Concentrações máximas verificadas: - BPA (2,97 µgL <sup>-1</sup> ) no local 10; - Na foz, baixas concentrações de BPA (0,09 µgL <sup>-1</sup> ).
Noppe <i>et al.</i> , 2005	<b>Estrogénios</b>	Estuário Scheldt (Bélgica)	- Elevadas concentrações de E1 (>7ngL <sup>-1</sup> ); - E2 apenas detetado uma única vez, num único ponto.

<sup>8</sup> Salientar que a água utilizada para consumo é extraída do lago Kinneret.

<sup>9</sup> Este estudo demonstrou que as águas superficiais de Paris apresentam níveis de contaminação por compostos estrogénicos. Descargas pelas ETARs poderão ser a causa destes níveis havendo a necessidade de melhorar a taxa de sucesso para a eliminação destes compostos.

#### 2.4.1.2. Estudos Nacionais

Em território nacional, os estudos sobre EDCs tem vindo a aumentar. De entre a literatura acessível ao público geral, são conhecidos alguns estudos nacionais cujos resultados denotam efeitos de disrupção endócrina em diversas espécies do meio aquático (Santos *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2009; Madureira *et al.*, 2011; Urbatzka *et al.*, 2012).

No que concerne a estudos de deteção de EDCs em ambientes aquáticos, em particular compostos estrogénicos, bisfenol, alquilfenóis e fitoestrogénios, são já conhecidos níveis de concentração que evidenciam a presença destes compostos em estuários portugueses. De entre estes, os estuários do Ave, Leça, Douro, Ria de Aveiro, Mondego e Sado, são seis dos estuários portugueses nos quais se evidenciou, em alguns dos casos, níveis de concentração preocupantes. Também no Minho, Lima e Guadiana foram detetados os alguns destes EDCs no entanto, em níveis muito mais baixos relativamente aos estuários anteriormente mencionados. Para além dos estudos realizados em estuários portugueses também são conhecidos valores de concentração de EDCs detetados em estações de tratamento de efluentes (Maurício *et al.*, 2006; Chambel, 2011).

É de salientar que, a maioria dos trabalhos foram desenvolvidos e de referência para o presente trabalho, foram realizados pela equipa liderada pelo Professor Doutor Eduardo Rocha e pela Professora Doutora Maria João Rocha do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR). Nestes trabalhos utilizou-se, o GS-MC e o HPLC-DAID como metodologia de deteção e quantificação dos níveis de EDCs.

A Tabela 5 resume alguns dos estudos realizados, cuja informação está disponível e acessível ao público geral até à data, para a deteção de EDCs em estuários portugueses.

**Tabela 5** - Estudos realizados em diversos estuários nacionais nos quais foi detetada a presença dos EDC's em estudo.

Estuário	EDC	Níveis detetados	Referência
<b>Minho</b>	Bisfenol	- Concentração máxima detetada em matriz de sedimento: 0,1-0,6 ngg <sup>-1</sup> .	Almeida <i>et al.</i> ,2007
	Estrogénios	- Concentração máxima detetada para E2: 0,130 ngL <sup>-1</sup> - Concentração máxima detetada para E1: 0, 110 ngL <sup>-1</sup>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2006
<b>Lima</b>	Estrogénios	- Concentração máxima detetada para E2: 0,160 ngL <sup>-1</sup> - Concentração máxima detetada para E1: 0,183 ngL <sup>-1</sup>	
<b>Ave</b>	Estrogénios	- Intervalo de concentração máxima detetada: 0,3 - 20,5ngL <sup>-1</sup>	Rocha <i>et al.</i> , 2013
	Bisfenol	- Concentração máxima detetada: 521,8ngL <sup>-1</sup>	
<b>Leça</b>	Estrogénios	- Intervalo de concentração máxima detetada para E1, E2 e EE2: 2,1-9,9ngL <sup>-1</sup>	Rocha <i>et al.</i> , 2012b
	Bisfenol	- Intervalo de concentração máxima detetada: 30,6-62,4ngL <sup>-1</sup>	
<b>Douro</b>	Bisfenol	- Intervalo de concentração máxima detetada: 59.0-378.0ngL <sup>-1</sup>	Almeida <i>et al.</i> ,2007
	Estrogénios	- Concentração máxima detetada para E1 e EE2: >100ngL <sup>-1</sup>	Ribeiro <i>et al.</i> , 2009c
	Bisfenol	- Concentração máxima detetada: >10ngL <sup>-1</sup>	
	Estrogénios	- Concentração máxima detetada para E1, E2 e EE2: ≤10ngL <sup>-1</sup>	Rocha <i>et al.</i> , 2012a
<b>Ria de Aveiro</b>	Bisfenol	- Intervalo de concentração máxima detetada: 34,9-59,5 ngL <sup>-1</sup>	
	Estrogénios	- Intervalo de concentração máxima detetada para E1:0,5-85ngL <sup>-1</sup> - Concentração máxima detetada para E2: 92ngL <sup>-1</sup>	Sousa <i>et al.</i> , 2010
		- Intervalo de concentração máxima detetada: 2.8-897ngL <sup>-1</sup> no verão e 2,6-316 ngL <sup>-1</sup> no inverno	
	Bisfenol	- Concentração máxima detetada: <1,1 ngL <sup>-1</sup>	Jonkers <i>et al.</i> ,2010
		- Concentração máxima detetada: 950 ngL <sup>-1</sup>	Quirós <i>et al.</i> , 2005
Estrogénios	- Intervalo de concentração máxima detetada para E2: 85,0-10,0ngL <sup>-1</sup>	Silva <i>et al.</i> , 2013	
<b>Mondego</b>	Bisfenol	- Concentração máxima detetada: >880,0ngL <sup>-1</sup>	Ribeiro <i>et al.</i> , 2009a
<b>Sado</b>	Estrogénios	- Concentração máxima detetada para E1 foi de 0,7-1,7ngL <sup>-1</sup>	Ribeiro <i>et al.</i> , 2009b
	Bisfenol	- Intervalo de concentração máxima detetada: 9.0-137.1 ngL <sup>-1</sup>	
<b>Guadiana</b>	Bisfenol	- Concentração máxima detetada: <0,1 ngL <sup>-1</sup>	Almeida <i>et al.</i> ,2007

Fazendo uma breve análise dos valores reportados nos estudos apresentados na Tabela 3, no que refere aos compostos estrogénicos, E1, E2, E3 e EE2, são comuns valores iguais ou superiores a  $10\text{ngL}^{-1}$  (Ave e Leça) (Rocha *et al.*, 2013 e Rocha *et al.*, 2012b), que no Douro atingem máximos dez vezes superiores (na ordem dos  $100\text{ngL}^{-1}$ ) (Ribeiro *et al.*, 2009a). Neste último estuário, a presença contínua e ubíqua de estrogénios naturais (E1) e sintéticos (EE2) atinge concentrações preocupantes. Os níveis detetados neste estuário são mesmo considerados como não seguros para espécies aquáticas e ser humano e requerem medidas urgentes de monitorização e mitigação. Pelo contrário, no Mondego, a contaminação por compostos estrogénicos naturais e sintéticos é relativamente baixa comparativamente aos níveis detetados nos estuários anteriormente referidos (Ribeiro *et al.*, 2009c). No que se refere ao BPA, e analisando a situação do rio Douro, este atinge concentrações superiores a  $10\text{ngL}^{-1}$  no ano de 2009 (Ribeiro *et al.*, 2009a) situação que, com o passar dos anos, parece ser agravada dado os níveis reportados no ano de 2012 onde o mesmo composto atinge níveis até  $60\text{ngL}^{-1}$  (Rocha *et al.*, 2012a). Fazendo uma análise da presença do BPA nos estuários do Ave e Mondego, este apresenta concentrações na ordem dos  $520\text{ngL}^{-1}$  a  $880\text{ngL}^{-1}$ , respetivamente (Rocha *et al.*, 2013 e Ribeiro *et al.*, 2009c). Na Ria de Aveiro é de salientar o nível detetado de BPA que atinge um máximo de  $897\text{ngL}^{-1}$  no verão e  $316\text{ngL}^{-1}$  no inverno (Sousa *et al.*, 2010), situação que pode ser considerada preocupante quando se compara os valores aqui reportados com os valores de concentração e efeitos associados que são apresentados na Tabela 3.

De acordo com o que é apresentado na Tabela 5, é importante salientar que, embora haja diferença de concentrações detetadas entre estuários, não é viável fazer uma seleção do estuário com maior nível de poluição. No entanto, e segundo resultados publicados acerca do mesmo estuário mas avaliando a presença de outros contaminantes, que não os presentes neste estudo, é do conhecimento científico que o estuário do rio Douro tem sido alvo de diversos estudos científicos pelos níveis de poluição detetados.

Comparando os valores aqui reportados com aqueles que foram observados em estuários internacionais (Tabela 3 e 4), verifica-se que os níveis internacionais, em alguns dos casos, superam as concentrações evidenciadas em território nacional. No entanto, os níveis reportados nos estudos internacionais estão maioritariamente associados ao desenvolvimento de um efeito específico que está à concentração detetada de EDC. Embora haja alguma discrepância entre os resultados internacionais e nacionais, estes resultados sugerem que os estuários nacionais deveriam ser mais vigiados, de forma

intensiva, para identificar não só as fontes de contaminação que possam vir a ser mitigadas como também possíveis efeitos de disrupção endócrina que eventualmente estejam associados à presença destes compostos.

Em alguns dos trabalhos desenvolvidos em território nacional foram investigadas também variações espaciais e temporais nos níveis de EDC's para além de uma observação pontual. É de salienta-se por exemplo o estuário do rio Sado onde, ao longo do gradiente de salinidade, se observaram concentrações significativamente diferentes, com valores máximos próximos da foz. O comportamento sazonal de cada composto foi variável de estuário para estuário. No estuário do rio Ave, a concentração de BPA foi mais elevada no outono e no estuário do rio Douro, as concentrações de estrogénios apresentaram níveis mais elevados no inverno.

Para além dos níveis de concentração aqui reportados importa referir que nestes trabalhos não só foi avaliada a presença de compostos estrogénicos e bisfenol, prioritários para o presente estudo, como outros EDCs, nomeadamente alquilfenóis e fitoestrogénios. É de salientar ainda que os níveis evidenciados para estes compostos são, em alguns dos casos, superiores aos reportados para estrogénios e bisfenol havendo a necessidade de avaliar o impacto que estes compostos podem acarretar não só para os ecossistemas onde são inseridos mas também para as espécies e o próprio Homem.

## **2.5. Metodologias de deteção de EDCs**

A quantificação da contaminação da água durante anos ficou restrita à monitorização de alguns dos parâmetros físico-químicos, nomeadamente carência bioquímica em oxigénio, oxigénio dissolvido, nitratos e fosfatos e sólidos em suspensão (Cirja *et al.*, 2008). Com o conhecimento da existência e presença de EDCs no ambiente, surge a necessidade de ter métodos universais pelos quais seja possível detetar a sua presença e posteriormente quantificar e determinar os efeitos nos organismos. Esta situação, sendo bastante delicada e preocupante, pode explicar de certa forma a falta de regulamentação específica focada no assunto (Janex-Habibi *et al.*, 2009).

A maioria dos EDCs surge nos ecossistemas aquáticos em concentrações frequentemente muito baixas. A deteção destes compostos, nestas circunstâncias, requer a utilização de técnicas especializadas, cujo método analítico de deteção e quantificação seja adequado aos níveis de contaminação presente nas matrizes ambientais de estudo. Nestas matrizes complexas estão incluídas, por exemplo, as águas superficiais e

subterrâneas, os efluentes domésticos, industriais e hospitalares, ou mesmo matrizes sólidas de solo, sedimento marinho ou lodo biológico (Bila e Dezotti, 2007). Hoje, existem diversos métodos analíticos para a determinação de EDCs, sendo que os primeiros testes foram desenvolvidos com matrizes de sangue, urina e tecido e, mais tarde, adaptados para matrizes ambientais, como água (Bila e Dezotti, 2007).

Atualmente, são vários os métodos analíticos utilizados para a detecção de EDCs, desenvolvidos para que seja possível a determinação de concentrações na ordem dos  $\mu\text{gL}^{-1}$  e  $\text{ngL}^{-1}$  (Burkhardt-Holm, 2010; Tylingo *et al.*, 2010). Para matrizes de amostras aquosas, os métodos analíticos mais modernos são a extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction, SPE*), numa fase inicial de extração dos compostos, e detecção por cromatografia, espectrometria e imunoenaios (Bila e Dezotti, 2007; Burkhardt-Holm, 2010; Cirja *et al.*, 2008; McMaster, 2008; Tylingo *et al.*, 2010).

Para a detecção e quantificação de EDCs é necessário uma preparação inicial das amostras. A extração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Extraction, SPE*, é atualmente uma das técnicas mais utilizadas para a extração de EDCs presentes nas matrizes aquosas havendo no entanto outros métodos pelos quais o mesmo objetivo é viável. A SPE é uma técnica de extração rápida, simples apresentando como principal inconveniente o facto de poder haver perdas de composto relativamente à concentração inicial, uma vez que quantas mais forem as etapas da técnica mais provável é haver alterações nas concentrações. É um método de separação líquido-sólido, no qual se utilizam colunas abertas, designadas por cartuchos de extração. Estas colunas contêm uma fase sólida (sílica), na qual fica retido o analito, devido à ligação química que se desenvolve com os grupos funcionais orgânicos hidrofóbicos dos EDCs na matriz, posteriormente eluído com um solvente.

A eluição dos analitos, em solventes específicos, é um requisito importante pois de acordo com a técnica de detecção e quantificação a utilizar, esta necessitará que a amostra esteja eluída num solvente específico para a técnica.

De entre as técnicas de detecção e quantificação, a cromatografia é uma das técnicas mais utilizadas e com melhor desempenho, podendo ser combinada com outros sistemas de detecção. Atualmente, as técnicas cromatográficas mais utilizadas são: a cromatografia líquida (*Liquid Chromatography, LC*), a cromatografia líquida de alta-eficiência (*High-Performance Liquid Chromatography, HPLC*) e a cromatografia gasosa (*Gas Chromatography, GC*).

Para além das técnicas cromatográficas, os imunoensaios são também uma opção para a determinação de EDCs em matrizes aquáticas. Estes apresentam diversos ensaios biológicos, no entanto os ensaios de imunoabsorção enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA*) são os mais utilizados.

Como em todas as técnicas, cada método utilizado apresenta vantagens e inconvenientes que de certa forma são pontos-chave a ter em conta no momento de escolha da técnica mais adequada para cada estudo. Na Tabela 6 são apresentadas algumas das vantagens e inconvenientes das principais técnicas utilizadas para a deteção e quantificação de EDCs em matrizes aquáticas.

**Tabela 6** - Vantagens e inconvenientes das principais técnicas utilizadas para a deteção e quantificação de EDCs em matrizes aquáticas.

<b>Técnica</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Inconvenientes</b>
<b>Cromatografia Gasosa</b>	Fácil manuseamento, baixos custos; alta seletividade; grande precisão; eficiência de separação para os diferentes componentes de uma mistura inicial.	Necessidade de volatilizar os compostos; elevados custos de manutenção.
<b>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</b>	Alta resolução, eficiência e detetabilidade; capacidade de realizar separações e análises para uma variedade de compostos; tempo de análise em poucos minutos.	Elevados custos de manutenção.
<b>Espectrometria de Massa</b>	Aumenta os limites de deteção e minimiza erros de deteção.	Elevados custos de manutenção; resolução limitada; baixa sensibilidade.
<b>Imunoensaios</b>	Alta sensibilidade; vasta aplicabilidade; facilidade de manuseamento; simples pré-processamento das amostras; capacidade de análise de várias amostras ao mesmo tempo; útil em trabalhos de campo; tempo de análise curto.	Vulnerável a reações cruzadas; imprecisos para amostras com baixas cargas de poluentes havendo a necessidade de confirmação por técnicas cromatográficas; síntese de anticorpos é difícil e dispendiosa e apenas uma substância específica pode ser analisada.

No que concerne aos objetivos de estudo delineado para este trabalho e tendo em conta a literatura disponível, na Tabela 7 são apresentadas resumidamente as principais técnicas utilizadas na deteção dos compostos em estudo.

**Tabela 7** - Metodologias mais utilizadas para a deteção dos compostos em estudo.

EDCs	Técnica de deteção	Referência
<b>Hormonas naturais</b>	Estrona	LC-MS; LC-ESI-MS/MS; GC-MS; HPLC-DAD; ELISA
	17 $\beta$ -estradiol	LC-MS/MS; LC-ESI-MS/MS; GC-MS; HPLC-DAD; ELISA
	Estriol	LC-ESI-MS/MS
<b>Hormonas sintéticas</b>	17 $\alpha$ -etinilestradiol	HPLC; LC-ESI-MS/MS; HPLC-DAD; ELISA
<b>Fenóis</b>	Bisfenol-A	LC-MS/MS; HPLC; GC-MS/MS; ELISA

**LC-MS** - Liquid chromatography–mass spectrometry; **LC-ESI-MS/MS** - Liquid chromatography-electrospray ionization/multi-stage mass spectrometry; **LC-MS/MS** - Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; **GC-MS** - Gas chromatography–mass spectrometry; **HPLC** - High-performance liquid chromatography; **MS** - Mass spectrometry; **ELISA** - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

Para o presente trabalho foram consideradas duas técnicas principais para a extração, deteção e quantificação dos EDCs em estudo. Numa fase inicial, para a extração dos compostos foi utilizada a técnica *SPE* e posteriormente foram utilizados diversos Kits de imunoensaios ELISA para a deteção dos EDCs relevantes para este estudo. Todas as técnicas foram elaboradas seguindo os protocolos específicos: a *SPE* foi realizada segundo o descrito no estudo realizado por Ribeiro e colaboradores (2009a) e os imunoensaios foram realizados segundo o disposto nos protocolos da Tokiwa Chemical Industries CO., Ltd.

### 2.5.1. Metodologias adotadas para a deteção e quantificação dos EDCs em estudo

Neste trabalho foram utilizados imunoensaios de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Os imunoensaios apresentam diversas vantagens de entre as quais se destaca a facilidade de manuseamento, a capacidade de análise de várias amostras ao mesmo tempo, a alta seletividade e o tempo de análise e obtenção de resultados curto. Muitos dos estudos realizados denotam uma grande correlação entre os resultados obtidos por técnicas cromatográficas e ensaios ELISA.

### 2.5.1.1. Imunoensaios ELISA

Os ensaios Elisa, do inglês *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, são também conhecidos por Imunoensaios Enzimáticos (EIA). É uma técnica de bioquímica muito utilizada na identificação de determinados antígenos para os quais existem anticorpos de reconhecimento específico. A técnica de ELISA combina a utilização de anticorpos específicos com a sensibilidade de antígenos acoplados a uma enzima que, quando ligados entre si emitem um sinal de presença através de um produto com cor. Dependendo do kit adquirido, a base da técnica está na utilização de uma placa, na qual são realizadas diversas misturas de soluções que, de acordo com o protocolo adequado ao tipo de kit, numa etapa final dará um produto com cor. Depois, é submetido a um leitor de placas ELISA, através do qual se obtém um valor de absorvância. Este valor de absorvância é então convertido num valor de concentração do antígeno específico em estudo.

As placas de ELISA são, no geral, feitas à base de poliestireno, ou derivados de poliestireno, cuja organização se dispõe em 96 poços, distribuídos por 8 linhas e 12 colunas. Nos kits mais antigos o conteúdo dos mesmos assim como o manuseamento da técnica era um tanto moroso pelo facto de ser necessária uma prévia preparação de diversas soluções assim a como a preparação e deposição do anticorpo no interior de cada poço. Hoje, com o avanço das tecnologias, os kits comercializados apresentam-se mais simples e um bom exemplo desta facilidade de manuseamento são os kits utilizados na deteção e quantificação dos EDCs em estudo. A desvantagem desta técnica está no facto de ser muito dispendiosa.

## Capítulo 3 – Materiais e Métodos

---

### 3.1. Áreas de estudo

No âmbito do presente trabalho científico estão enquadrados três estuários de rios portugueses - Minho, Ave e Mondego. Estes estuários pertencem a três Bacias Hidrográficas distintas e apresentam diferenças entre si, não só nas dimensões como também nas suas comunidades bióticas e nos seus níveis de poluição.

#### 3.1.1. Breve descrição da Bacia Hidrográfica do rio Minho

A Bacia Hidrográfica do rio Minho, representada no Anexo 1, apresenta uma área total de cerca de 17 080Km<sup>2</sup>, dos quais 95% situam-se na Espanha (16226 Km<sup>2</sup>) e apenas 5% pertencem a Portugal (846 Km<sup>2</sup>) (Pinheiro, 1998). Está localizada no extremo Noroeste de Portugal (Maia-Mendes, 2007), com orientação Leste-Oeste e é caracterizada pela existência de duas linhas de água principais: o rio Minho e o rio Síl, no conjunto de 14 afluentes que apresenta. O rio Síl, por sua vez, é o maior afluente do rio Minho. A Bacia Hidrográfica do rio Minho é limitada a Sul pela Bacia do rio Lima, a Sudeste pela Bacia do rio Douro e a Norte pelas Bacias Hidrográficas da costa espanhola. Em Portugal, a Bacia Hidrográfica do rio Minho é a segunda bacia internacional mais pequena, sendo o primeiro lugar ocupado pela Bacia do rio Lima (INAG, 2001). No que concerne à extensão portuguesa do rio Minho, os principais afluentes são, de montante para jusante: o rio Trancoso (cerca de 26Km<sup>2</sup>), o rio Mouro (141Km<sup>2</sup>), o rio Gadenha (82Km<sup>2</sup>) e o rio Coura (268Km<sup>2</sup>) (Lobo, 2012). A Bacia Hidrográfica do rio Minho é limitada em três vertentes: a norte pelas Bacias hidrográficas da costa norte espanhola, a sul pela Bacia do rio Lima e as ribeiras da costa atlântica, e a sudoeste pela Bacia Hidrográfica do rio Douro. É considerada a segunda Bacia Hidrográfica mais pequena de Portugal, sendo a primeira referente ao rio Lima (APA, 2012; PBH, 2001). A área geográfica abrange 6 concelhos (Caminha, Vila Nova de Cerveira, Valença, Paredes de Coura, Monção e Melgaço), todos pertencentes ao distrito de Viana do Castelo.

Embora pequena no que concerne à parte portuguesa, a Bacia Hidrográfica do rio Minho enquadra um complexo diversificado de ecossistemas a que se associam habitats e espécies florísticas e faunísticas de elevado valor conservacionista, sendo uma das áreas mais importantes para a conservação de espécies piscícolas (Pinheiro,1998; Associação de Municípios do Vale do Minho, 2011).

O rio Minho, representado na Figura 3, é um rio internacional cuja nascente se situa em Espanha, na Serra de Meira, a uma altitude de cerca de 750 metros. Localizado a noroeste da Península Ibérica, com orientação nordeste-sudeste, entre as coordenadas 41°45' e 43°40' de latitude norte e 06°10' e 8°55' de longitude oeste, desagua no Oceano Atlântico, entre os concelhos de Caminha e La Guardia (INAG, 2001; Picanço, 2007). Apresenta uma extensão total de cerca de 300Km, dos quais apenas 70Km se situam em território português, correspondendo à distância percorrida entre Melgaço e a foz, em Caminha.



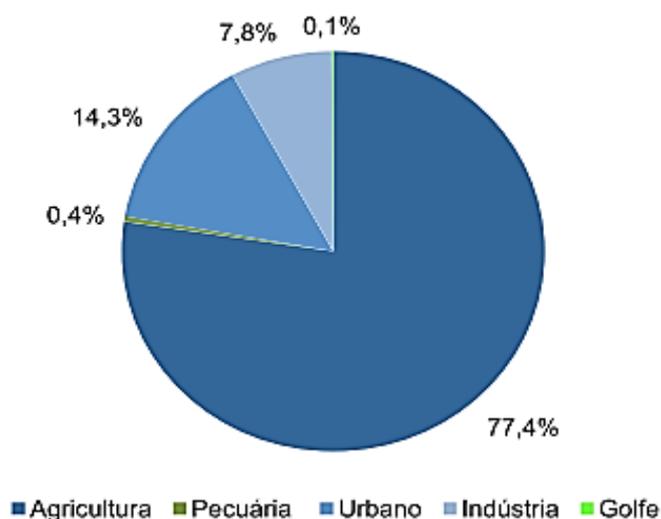
**Figura 3** - Localização do rio Minho.

O estuário do rio Minho, com orientação aproximada de NNE-SSO e origem tectónica, enquadra um conjunto diversificado de valores ecológicos, que justificam a sua integração em áreas de conservação da natureza. A grande diversidade de habitats juntamente com as características geográficas e clima predominantes, criam condições necessárias para a permanência de diversas espécies. O estuário do rio Minho integra uma zona húmida de grande valor ecológico, está incluído na rede de locais portugueses protegidos pela Rede Natura 2000 e a sua faixa litoral, a sul da Foz (Moledo), possui um espaço classificado como área de interesse para a conservação da natureza no âmbito do Projeto Biótopos/Corine (Vale do Minho) (INAG, 2001, APA, 2012).

Como descrição sucinta da área adjacente à Bacia Hidrográfica do rio Minho, salienta-se a forte componente de vegetação ripícola ao longo de todo o trajeto percorrido pelo rio Minho, para além das zonas urbanas, pólos industriais (quer na parte portuguesa quer na parte espanhola) e forte atividade agrícola predominante. O sector do turismo, principalmente balnear, a pesca desportiva e a agricultura são três das principais atividades humanas.

A ocupação do solo assim como a localização dos principais pólos industriais portugueses e os sistemas de saneamento próximos ao rio Minho são apresentados nos Anexos 2, 3 e 4 respetivamente (APA, 2012).

Na Figura 4 é apresentado, de uma forma resumida, a distribuição das necessidades de abastecimento de água a partir do rio Minho.



**Figura 4** - Distribuição das necessidades de abastecimento de água para o setor agrícola, industrial, pecuário, urbano e lazer (golfe) a partir do rio Minho. Fonte: APA, 2012.

### 3.1.1.1. Pressões antropogénicas

As regiões costeiras do Alto Minho foram sempre alvo de pressões por parte do ser humano. A região abrangida pela Bacia Hidrográfica do rio Minho não é exceção, embora a pressão exercida seja muito mais baixa quando comparada com outros estuários do nosso país.

O rio Minho apresenta alguns problemas de poluição sendo as descargas dos efluentes domésticos e industriais duas das principais fontes de contaminação do ecossistema quer na parte portuguesa quer na parte espanhola (Picanço, 2007). De acordo com o plano de gestão da região hidrográfica do Minho/Lima (APA, 2012), os efluentes industriais são aqueles que mais contribuem para a poluição do ecossistema aquático, em termos de carga poluente orgânica.

Relativamente à parte portuguesa, os resíduos industriais tem pouco influência na poluição registada na área sendo apenas de salientar à forte área industrial, do Parque Industrial de Vila Nova de Cerveira, localizado na freguesia de Campos. Na margem espanhola, a situação é bastante mais grave dado que grande parte do seu percurso e afluentes, o rio Minho recebe uma grande parte dos efluentes provenientes da intensa atividade industrial espanhola, principalmente área industrial de Ourense, e em pleno estuário do rio Minho, efluentes do parque industrial de Porriño (Alves, 1996). O rio Louro, um afluente espanhol, é referido como sendo muito contaminado devido à presença de uma zona de intensa pressão industrial nas suas imediações, podendo contribuir para a contaminação do estuário do rio Minho com aportes atualmente desconhecidos (APA, 2012). Por outro lado, o setor agrícola é o que mais contribui com elevadas cargas de nutrientes, nomeadamente azoto (N) e fósforo (P). No que concerne aos restantes setores (nomeadamente pecuária, aquicultura e campos de golfe), as cargas poluentes não são significativas quando comparadas com as dos setores urbanos, agrícola e industrial.

No Anexo 5 é apresentada a localização das eventuais zonas de risco de poluição referentes à parte portuguesas, nomeadamente zonas de descarga de efluentes industriais e ETARs (APA, 2012).

### **3.1.2. Apresentação geral dos estuários utilizados na comparação com o estuário do rio Minho**

#### **3.1.2.1. Estuário do rio Ave**

O rio Ave é um rio nacional que nasce na Serra da Cabreira, no concelho de Vieira do Minho, a uma altitude de cerca de 1200 metros. Após um percurso de aproximadamente 94Km numa direção este-oeste desagua no Oceano Atlântico, a sul de Vila do Conde (Silva, 2011b).

A Bacia Hidrográfica do Ave apresenta uma extensão de cerca de 1391km<sup>2</sup>. Os principais tributários são os rios Este (margem direita) e Vizela (margem esquerda) que

drenam uma área de 247km<sup>2</sup> e 340km<sup>2</sup> respetivamente. A Bacia do Ave é rodeada a norte pela Bacia Hidrográfica do rio Cávado, a oriente pela Bacia Hidrográfica do rio Douro e a sul pela Bacia Hidrográfica do rio Leça (INAG, 2001). No total nacional a Bacia Hidrográfica do rio Ave ocupa cerca de 6% do norte de Portugal (Rocha *et al.*, 2013).

Ao longo dos tempos, diversas foram as fontes de contaminação do estuário, nomeadamente os efluentes urbanos e industriais, a agricultura, os aterros sanitários e as extrações minerais (Oliveira, 2006). De facto, verifica-se que a Bacia Hidrográfica do Ave é fortemente afetada pela industrialização, com sectores de atividade que envolvem, não só, grandes consumos de água como também, grandes cargas de poluição. Os efluentes urbanos e industriais não tratados que desaguam no Ave contribuíram, ao longo de várias décadas, para a classificação das águas como impróprias para consumo e, em várias zonas, até mesmo como inadequadas para contacto (MARETEC, 2013). Apesar de ainda existir vida fluvial, em vários troços não existe qualidade apropriada para a viabilidade de vida aquática. No que concerne à presença de valores ecológicos, estes surgem em níveis baixos como consequência das más condições físicas, químicas e biológicas da água.

Nos últimos anos diversos foram os estudos que pretenderam focar os elevados níveis de poluição aquática no estuário do Ave. Recentemente houve também investimentos no tratamento de efluentes que drenam para o Ave incluindo a construção de ETARs inseridas no projeto de despoluição da Bacia Hidrográfica do Ave que se espera que estejam a contribuir para a redução dos níveis de poluentes.

### 3.1.2.2. Estuário do rio Mondego

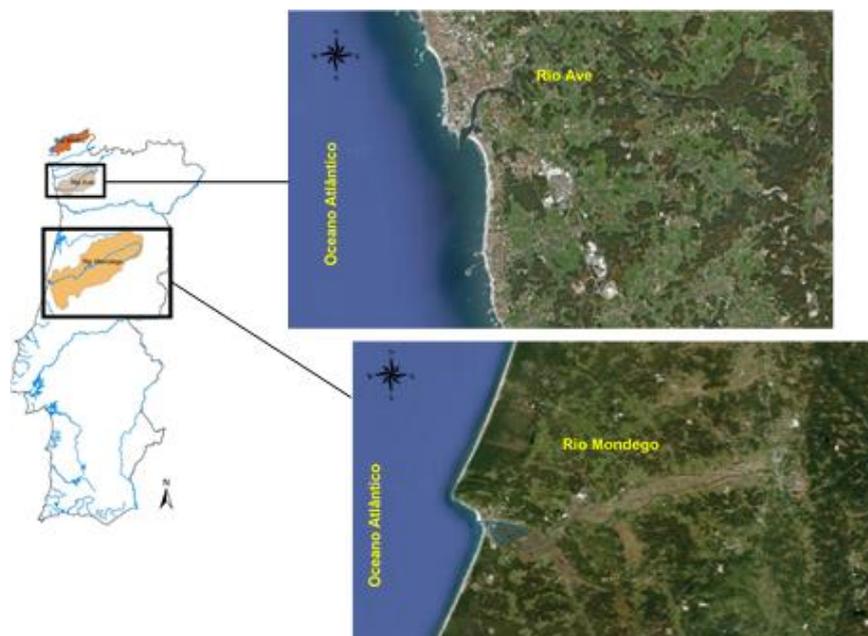
O rio Mondego é um dos cinco rios mais extensos totalmente em território nacional. Está localizado na costa atlântica portuguesa, nas coordenadas 40°08'N, 08°50'W. Nasce na Serra da Estrela, em Corgo das Mós, a uma altitude de 1525 metros e flui para o Oceano Atlântico, desaguando junto à Figueira da Foz, após um percurso de cerca de 227Km<sup>2</sup> (Ribeiro *et al.*, 2009c). A Bacia Hidrográfica do rio Mondego apresenta uma extensão de 6645Km<sup>2</sup>, com uma orientação sudeste-nordeste. Os seus principais afluentes são o Dão (margem direita), o Alva, o Ceira, o Ega, o Arunca e o Pranto (margem esquerda).

O estuário do rio Mondego é considerado um sistema intertidal temperado de 8,6Km<sup>2</sup> que compreende, na parte terminal, dois “braços” distintos que estão separados por um aluvião – Ilha da Morraceira (Grilo *et al.*, 2011), a cerca de 7,4Km da sua foz. O braço sul é um sistema de águas rasas cuja profundidade em maré alta é de 2 a 4

metros, com uma amplitude de maré de 1 a 3 metros (Ferreira *et al.*, 2004). Apresenta uma área de cerca de 1200 hectares com elevado interesse ecológico. Neste domínio, a Ilha da Morraceira é a unidade territorial com maior interesse.

No seu percurso, da nascente à foz, atravessa áreas rurais, industrializadas, urbanizadas e agrícolas. A montante do estuário, as principais fontes de poluição são as águas residuais, na sua maioria provenientes das ETARs, efluentes industriais (estaleiros de construção naval e armazéns) e os escoamentos agrícolas, numa área total de 15000 hectares cultivados, onde predomina a plantação de milho e arroz (Ferreira *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2009c). Em consequência destes factos, são libertadas no estuário quantidades significativas de fertilizantes, principalmente do rio Pranto, informação que está associada aos elevados níveis de fitoestrogénios evidenciados no local (Ribeiro *et al.*, 2009c).

A Figura 5 apresenta a localização das Bacias Hidrográficas do rio Ave e Mondego.



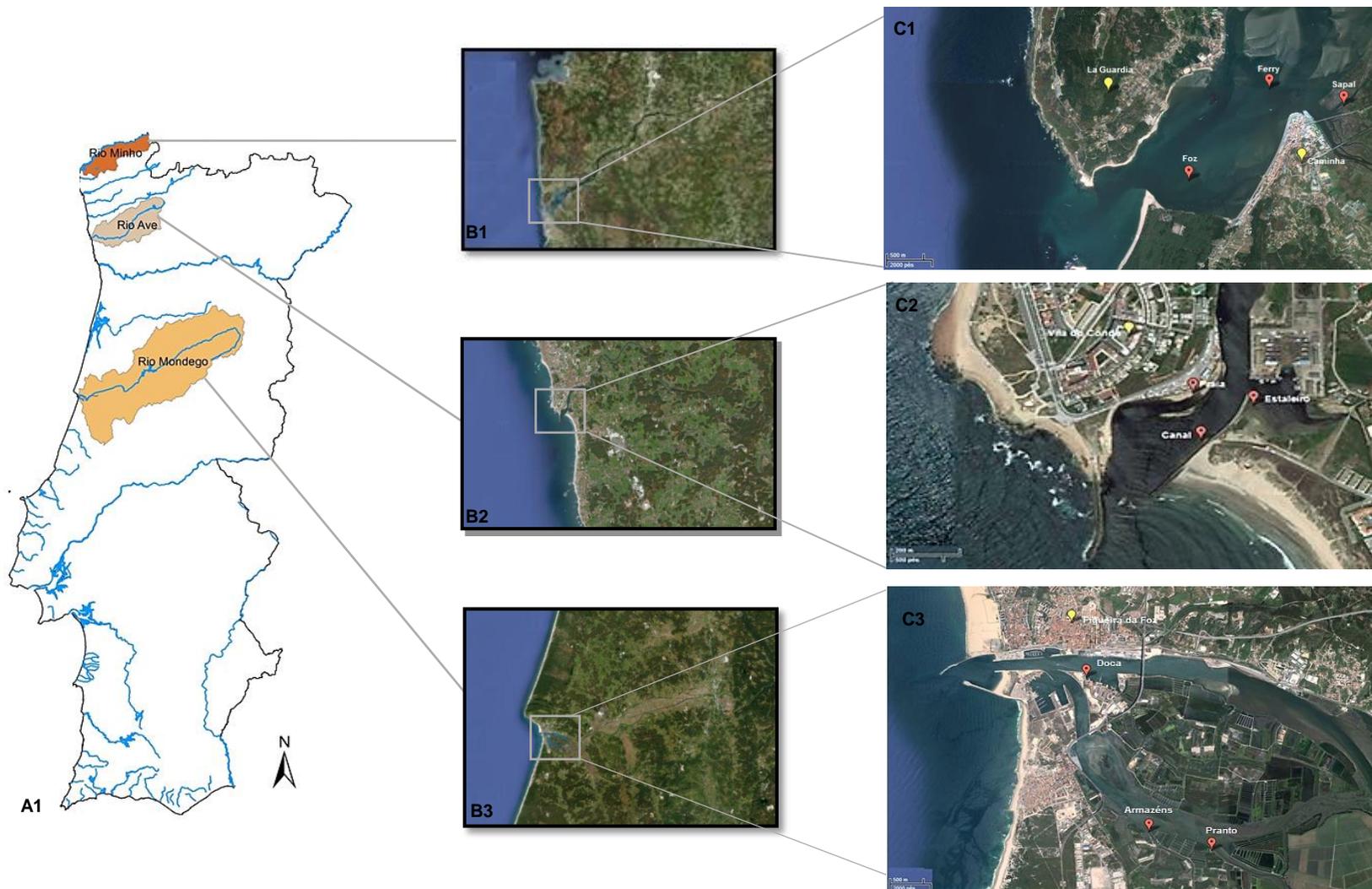
**Figura 5** - Localização das Bacias Hidrográficas do Ave e Mondego. Adaptado do Google Maps.

## 3.2. Amostragem

### 3.2.1. Identificação dos pontos de amostragem

Nos três estuários, anteriormente descritos, foram recolhidas amostras de água, em três pontos de amostragem previamente selecionados, ao longo do gradiente de salinidade. Adicionalmente foi recolhida, aleatoriamente, uma réplica de um dos pontos de amostragem. Estes são locais com notória abundância de anfípodes cujo estudo de “estados de intersex” (projeto INPACTAR) será futuramente útil para a confrontação com os resultados do presente trabalho. São também locais de grande predominância turística e perto dos quais estão localizados sistemas de saneamento, zonas agrícolas e efluente de ETARs de caminha. É de salientar também a forte área industrial localizada a montante da Foz (freguesia de Campos).

Os pontos de amostragem e respetiva denominação são apresentados na Figura 6. Para facilitar a leitura do texto optou-se por designar por S1 o ponto localizado na Foz, por S2 o ponto localizado no Ferry e por fim S3 o ponto localizado no Sapal.



**Figura 6** - Localização geográfica das áreas de estudo. (A1) Localização das Bacias Hidrográficas; (B) Localização dos três estuários (B1-rio Minho, B2- rio Ave,B3-rio Mondego); (C) Localização dos pontos de amostragem (C1-rio Minho (Foz, Ferry e Sapal); C2-rio Ave (Estaleiro, Canal e Praia); C3-rio Mondego (Doca, Armazéns e Pranto). Adaptado do Google Maps.

### **3.2.2. Recolha das amostras**

Para a análise dos compostos em estudo, foram recolhidas amostras de 2 litros de água, nos três pontos de amostragem previamente selecionados, nos 3 estuários. Foi ainda recolhida uma amostra adicional para funcionar como réplica de confirmação de resultados, num dos três locais, selecionado aleatoriamente. A recolha das amostras foi realizada num ciclo anual. No Minho, dado desconhecer-se a existência ou não de flutuações sazonais, foi recolhida uma amostra por estação do ano. Assim sendo, as amostragens foram realizadas em abril de 2012 (primavera), agosto de 2012 (verão), outubro de 2012 (outono) e janeiro de 2013 (inverno). Nos outros 2 estuários a periodicidade foi menor, pois para o Ave já estavam descritas variações entre a primavera e o inverno, e no Mondego a concentração em EDCs não varia entre estações do ano. Assim, para o estuário do Ave foram recolhidas amostras nas estações da primavera, verão e inverno e para o estuário do rio Mondego foram recolhidas amostras nas estações da primavera e inverno. Para a recolha das amostras, no rio Minho, foi considerado o período da maré alta uma vez que a recolha das mesmas foi feita com recurso a embarcação, dada a coincidência de outros trabalhos em curso na equipa.

As recolhas das amostras de água, e registo dos parâmetros físico-químicos, foram realizadas à superfície. As garrafas de recolha, previamente lavadas e acidificadas (em laboratório) para remover resíduos passíveis de influenciar os resultados, foram lavadas pelo menos três vezes com a água do estuário antes da colheita da água em cada ponto de amostragem. Após a recolha das amostras, as garrafas foram mantidas refrigeradas até serem processadas em laboratório.

### **3.2.3. Parâmetros físico-químicos**

Em cada um dos pontos de amostragem do estuário do rio Minho, foram registados, em concordância com a recolha das águas, alguns parâmetros físico-químicos (abióticos). Com recurso a uma sonda YSI 6820 foram registados valores de temperatura (°C), concentração de oxigénio dissolvido (OD) ( $\text{mgL}^{-1}$  e percentagem de saturação), potencial de hidrogénio (pH), salinidade (psu), condutividade ( $\text{mScm}^{-1}$ ) e concentração em clorofilas ( $\mu\text{gL}^{-1}$ ). A recolha dos parâmetros físico-químicos referidos é importante dado o efeito que os mesmos exercem no ambiente aquático onde são detetados. Os dados de campo obtidos para o rio Minho estão apresentados no Apêndice 1.

No tratamento estatístico dos dados físico-químicos foi utilizado do *Software* estatístico PAST (*PAleontological STatistics*) e as opções gráficas do *Excel*. Numa primeira análise estatística, foi aplicado o teste de PERMANOVA (*Permutational Multivariate Analysis of Variance*) à globalidade dos resultados, fixando a “estação do ano” (quatro níveis: primavera, verão, outono e inverno) e o “ponto de amostragem” (com três níveis: Foz, Ferry e Sapal) como fatores, numa abordagem “*two-away*” incluindo a interação dos dois fatores. Este teste é análogo à ANOVA tradicional mas não é afetado pela distribuição não normal dos dados. Aplicou-se também a mesma análise a cada um dos parâmetros individualmente considerando os mesmos fatores.

### **3.3. Metodologias analíticas**

#### **3.3.1. Reagentes e Soluções**

Para a extração em fase sólida (*SPE*), os filtros de fibra de vidro 47 GF/C foram adquiridos na MILLIPORE e os cartuchos de 500mg Oasis HLD e de sílica Sep-Pak de 1g foram adquiridos na Waters Corporation (Milford, MA, EUA) (Rocha *et al.*, 2012a e b).

Para os kits ELISA, foi apenas necessária a preparação de uma solução de metanol 10% (v/v), a solução de lavagem e a solução conjugada do antigénio-enzima. É de salientar que estas duas últimas soluções vinham já preparadas num solução concentrada sendo apenas necessária a preparação da solução nos volumes que estavam detalhados em cada um dos protocolos. Sendo um kit recente, o integral das soluções necessárias para o desenvolvimento da técnica vinha já preparado no conteúdo do kit.

Todos os outros solventes utilizados foram adquiridos na Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) e a água ultra pura foi fornecida por um sistema de água Milli-Q (Ribeiro *et al.*, 2007 e Ribeiro *et al.*, 2009a e b).

## **3.3.2. Processamento das amostras**

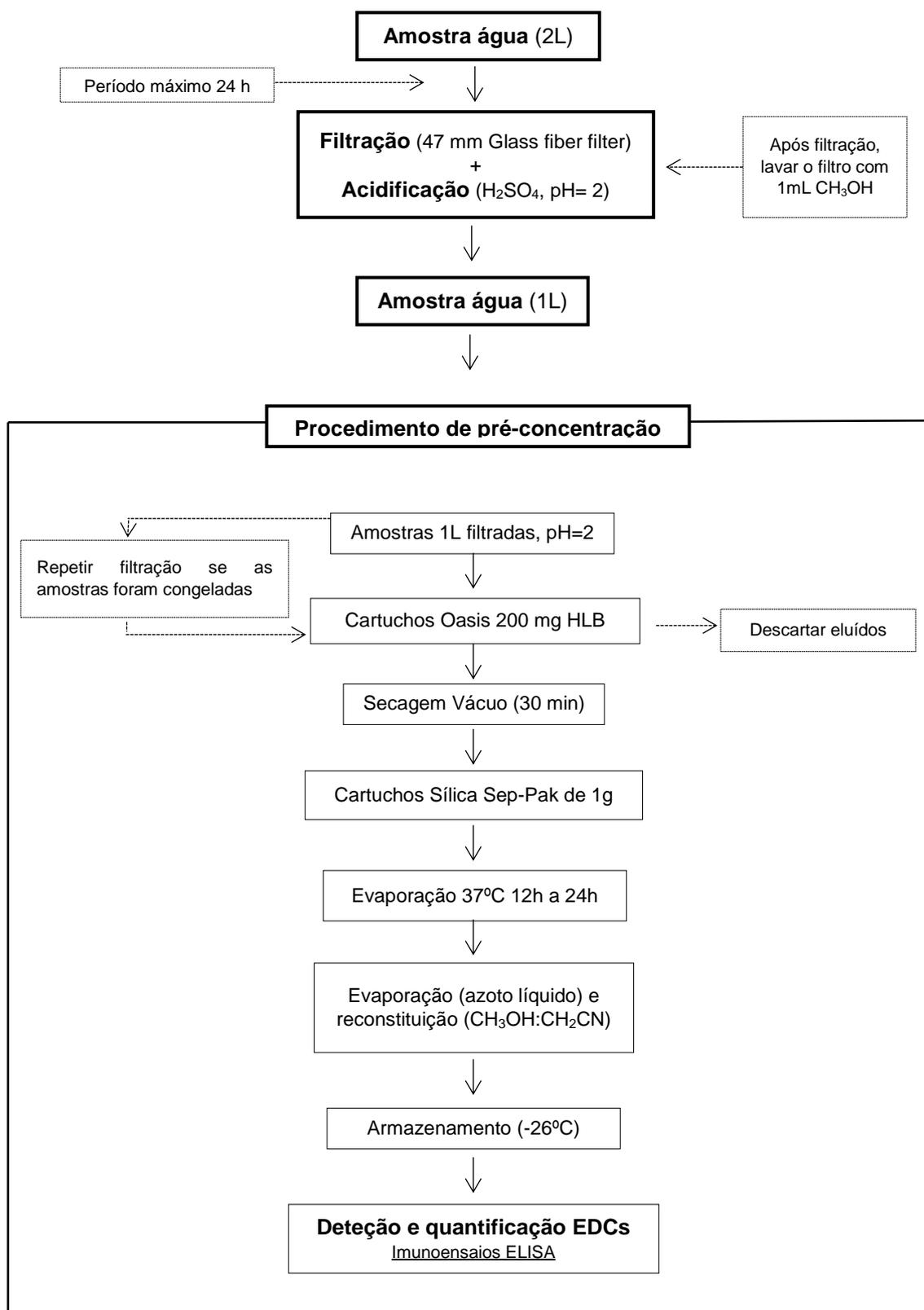
### **3.3.2.1. Pré-processamento**

Cada uma das amostras foi filtrada e acidificada num prazo máximo de 24h, após recolha nos estuários. Dos 2 litros de água recolhida, foi filtrada e acidificada apenas uma porção de aproximadamente 1 litro, sendo a amostra remanescente congelada por prevenção e, posteriormente, descartada, caso não fosse necessária. Para a filtração das amostras, que promove a eliminação de partículas em suspensão, foram utilizados filtros de fibra de vidro 47 GF/C. Toda a filtração foi feita em vácuo e após cada filtração, os filtros foram lavados com 1mL de metanol (CH<sub>3</sub>OH) (99% grau HPLC). Posteriormente à filtração foi realizada a acidificação de cada uma das amostras, para impedir a sua biodegradação. Na acidificação foi utilizado ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40%(v/v)) para obter um pH próximo de 2 em cada amostra. Este procedimento foi realizado sob agitação contínua.

## **3.3.3. Método para a extração das amostras**

### **3.3.3.1. Extração em fase sólida**

De forma resumida, na Figura 7 é apresentado um esquema com as principais etapas do tratamento das amostras.



**Figura 7** - Esquema geral do método analítico utilizado para a pré-concentração das amostras de água e posterior quantificação dos EDCs. Adaptado de Ribeiro *et al.*, 2007.

Todas as amostras recolhidas, depois de filtradas e acidificadas, foram submetidas a vácuo forçado, com fluxo constante de 5-7mL/min, através da utilização de um cartucho de 500mg Oasis HLD. Antes da sua utilização estes cartuchos foram lavados (ativados) duas vezes com 25mL de uma mistura de metanol:diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ ), numa proporção de concentração de 50:50 v/v, 12mL de metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) e, para finalizar, 25mL de água ultrapura Milli-Q. Posteriormente, foi então feita a passagem de cada amostra de água nos cartuchos de 500mg Oasis HLD. Após esta etapa, os cartuchos foram lavados com 25mL de água ultrapura e 1mL de  $\text{CH}_3\text{OH}$ . Seguiu-se um vácuo adicional de 30 minutos de forma a secar a água residual presente. Nesta etapa, foram utilizados 2 goblés contendo sílica, no interior da tina, para obtenção de uma secagem mais rápida. Para o processo de eluição, realizado após os 30 minutos da secagem, utilizaram-se 20mL de uma mistura de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ , numa proporção de concentração de 50:50 (v/v). No processo de eluição, todas as amostras foram transferidas para cartuchos de sílica Sep-Pak de 1g, previamente ativados com 20mL de uma mistura de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ . Numa etapa final, os eluídos foram recolhidos em tubos de fundo redondo. O seu conteúdo foi evaporado, recorrendo a uma estufa, sob uma temperatura aproximada de 40°C, num período máximo de 12 a 24 horas. Para concluir o processamento das amostras, foi realizada a evaporação/reconstituição das amostras. Este processo final foi realizado num banho termostático, a 37°C, sob uma corrente de azoto, e os eluídos foram dissolvidos em 500µL de uma mistura de metanol anidro ( $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{CN}$ ), numa proporção de concentração de 50:50 (v/v). Os eluídos foram guardados em *Vials*, devidamente identificados com a referência da amostra, mês e data, e foram congelados a -26°C para posterior quantificação.

### **3.3.4. Deteção e quantificação dos EDCs em estudo**

No presente trabalho foi utilizada como técnica de deteção e quantificação imunoensaios ELISA. O kits utilizados para a execução das análises tiveram por base uma reação competitiva, isto é, o composto a ser detetado na amostra em estudo irá competir com a solução conjugada antigénio-enzima, associada ao kit, pela ligação ao anticorpo específico, presente nos poços da microplaca onde ocorre a reação. Salientar que, a adição e posterior mistura dos dois compostos (amostra e solução conjugada) são primeiro realizadas numa placa sem anticorpo (*uncoated*) sendo depois transferidas para a placa com anticorpo (*coated*). A descrição deste processo será efetuada posteriormente.

Para o presente estudo foram adquiridos três kits ELISA, cada um com especificidade para um EDC em concreto. Os kits foram adquiridos à Tokiwa Chemical Industries CO., Ltd:

- Ecologiena<sup>®</sup> 17 $\beta$ -Estradiol (E2) ELISA Kit (Microplate) User's Guide;
- Ecologiena<sup>®</sup> Ethynylestradiol (EE2) ELISA Kit (Microplate) User's Guide;
- Ecologiena<sup>®</sup> Bisphenol (BPA) ELISA Kit (Microplate) User's Guide;

Antes de proceder à explicação sucinta das principais etapas dos kits utilizados é importante salientar que, de acordo com o protocolo de cada kit, o seu manuseamento apresenta como vantagem as grandes semelhanças entre protocolos, no que concerne às exigências que os mesmos requerem, não só para o tratamento das amostras como para as etapas de manuseamento. Assim, importa salientar que para os kits de deteção e quantificação de E2, EE2 e BPA as exigências requeridas são similares, principalmente no que respeita à reconstituição da amostra, cuja preparação deve ser feita em metanol 10% (v/v) (grau HPLC).

#### 3.3.4.1. Preparação das amostras

Antes de iniciar cada um dos ensaio ELISA foi necessário preparar as amostras segundo o exigido pelo protocolo. Assim, foi necessário verificar se o volume de amostra de cada um dos pontos dos três estuários, resultante da fase de extração por *SPE*, era igual a 500 $\mu$ l. Foi de facto confirmado à exceção da estação da primavera, cujo volume de amostra era inferior ao inicialmente pipetado. Para estas amostras foi necessário proceder a uma nova evaporação, seguida de reconstituição em 500 $\mu$ l de metanol anidro (CH<sub>3</sub>OH:CH<sub>3</sub>CN).

Após verificação dos volumes, 200 $\mu$ l da “amostra-mãe” (500  $\mu$ l) foram pipetados para alíquotas novas, devidamente etiquetadas, e esse conteúdo foi evaporado com posterior reconstituição em metanol (CH<sub>3</sub>OH) 10% (v/v) (grau HPLC). Após este passo, foi necessário proceder à realização de pré-testes de forma a saber se a concentração de amostra a utilizar era suficiente para pertencer ao range de valores da curva padrão associada a cada kit ou se era necessário fazer diluições das amostras. Foram então testadas duas diluições (1:10 CH<sub>3</sub>OH 10% e 1:100 CH<sub>3</sub>OH 10%) e a amostra sem diluição, de forma a saber qual dos resultados obtidos pertenceria à amplitude de valores associados à curva padrão. Depois de analisados os valores de absorvâncias e convertidos para as concentrações correspondentes, os valores obtidos foram comparados com os valores associados aos padrões, que formam a curva padrão. Assim, foi evidenciado que a diluição de 1:10 foi a mais adequada para a análise de E2,

ao passo que para o EE2 e BPA foi necessário fazer diluições de 1:5 e 1:100, respectivamente.

#### 3.3.4.2. Descrição sucinta do protocolo

A metodologia desenvolvida para a detecção e quantificação dos EDCs em estudo segue as indicações e etapas dispostas nos protocolos que acompanham os kits acima referidos

Na Figura 8 são apresentadas as principais etapas referentes ao protocolo de manuseamento dos kits utilizados.

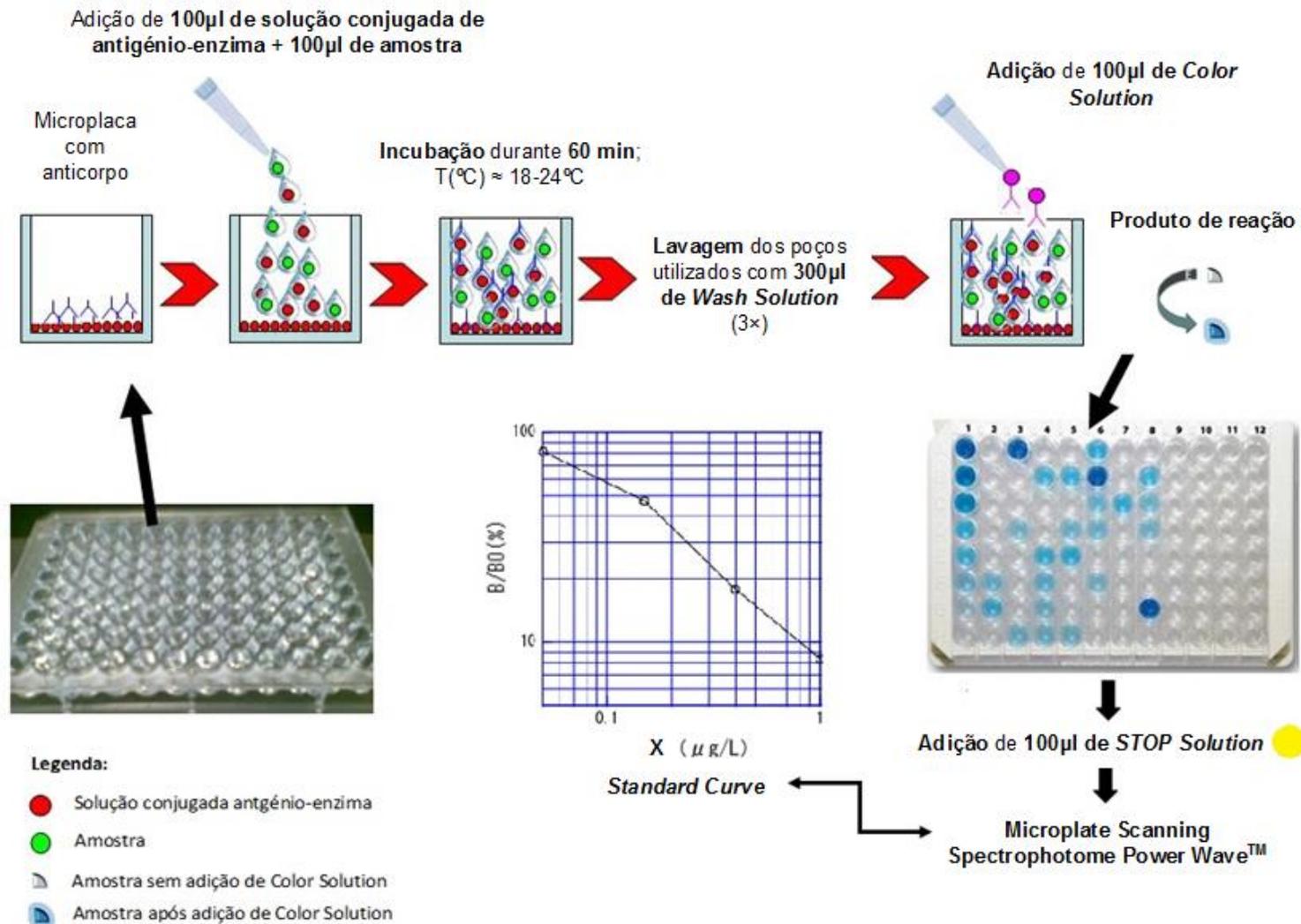


Figura 8 - Principais etapas de manuseamento dos kits ELISA para a análise dos EDCs em estudo.

As principais etapas para o manuseamento desta técnica são a adição de 100µl da solução conjugada de antígeno-enzima seguida da adição de 100µl das soluções padrão e amostras. Esta primeira etapa é realizada numa placa na qual não existe anticorpo associado aos poços (*Microplate Uncoated*). Após ressuspensão do conteúdo, este é então pipetado para a placa com o anticorpo associado (*Microplate Coated*), seguindo-se um período de incubação de 60 minutos a uma temperatura aproximada de 18 a 24°C. Salientar que a temperatura utilizada em cada um dos três kits variou entre 21 e 23°C. Após a incubação das amostras, foi feita uma sessão de três lavagens para cada um dos poços utilizados com 300µl de solução de lavagem (*Wash Solution*). Antes de proceder aos passos seguintes, é imprescindível que os poços estejam totalmente secos e sem formação de bolhas de ar. Posteriormente são então adicionados 100µl de solução de cor (*Color Solution*) através do qual se forma o produto de reação colorido (cor azul) resultante da ligação entre os anticorpos e antígenos ou anticorpos e composto específico presente na amostra. Segue-se então um novo período de incubação de 30 minutos (período no qual se desenvolve a cor azul). Para terminar, foram adicionados 100µl de solução de paragem (*STOP Solution*). A paragem da reação foi imediatamente observável pois o produto colorido azul passou a amarelo, como sinal de paragem de reação. Posteriormente foi realizada a leitura da placa, a absorvância de 450nm num aparelho específico para a leitura de placas ELISA.

#### 3.3.4.3. Leitura das placas e Software utilizado

A leitura das placas foi realizada utilizando o Microplate Scanning Spectrophotome Power Wave™ (Bio Tec Instrumentals). O software para a leitura dos resultados, associado ao programa, foi o KC Junior Operator's Manual BioTel® 340.

O tratamento estatístico dos resultados foi realizado recorrendo a um software online de análise estatística (Avery, 1997; Ahmed, 2013). Para a análise, as concentrações dos três compostos foram comparadas recorrendo a um teste não paramétrico (Mann-Whitney U Test) devido ao número de amostras efetuadas. As concentrações foram comparadas entre estuários, por estação de ano e ao longo do gradiente de salinidade.

## Capítulo 4. Análise e Discussão dos resultados

---

### 4.1. Parâmetros físico-químicos

A avaliação da qualidade da água é geralmente baseada na medição de parâmetros físico-químicos e bacteriológicos, indicadores numéricos utilizados pelas entidades controladoras para aferir a tipologia e qualidade da água de determinado meio.

No presente trabalho foram apenas registados os parâmetros físico-químicos e os dados obtidos para a discussão dos resultados são apresentados nas Figuras 9 a 15 e nos Apêndice 1 e 2.

Os resultados obtidos pela análise de variância não paramétrica (*two away PERMANOVA*) evidenciam diferenças significativas nos parâmetros abióticos entre as estações do ano e entre os pontos de amostragem (estação: pseudo- $F=11,83$ ;  $p<0,0001$ ; ponto de amostragem: pseudo- $F=18,89$ ;  $p<0,0001$ ), mas não na interação *estação do ano x ponto de amostragem* ( $p>0,05$ ).

Fazendo uma análise univariada (por recurso a uma ANOVA), cada variável abiótica apresentou um padrão diferente (Anexo 8 - Tabela 14). No geral, todos os parâmetros abióticos, exceto do pH e a concentração de clorofilas, apresentaram variações sazonais com diferenças significativas. O pH apenas apresentou diferenças significativas quando comparado por ponto de amostragem, e para a concentração em clorofilas.

No geral, não se verificaram variações significativas quer para ponto de amostragem quer para estação do ano.

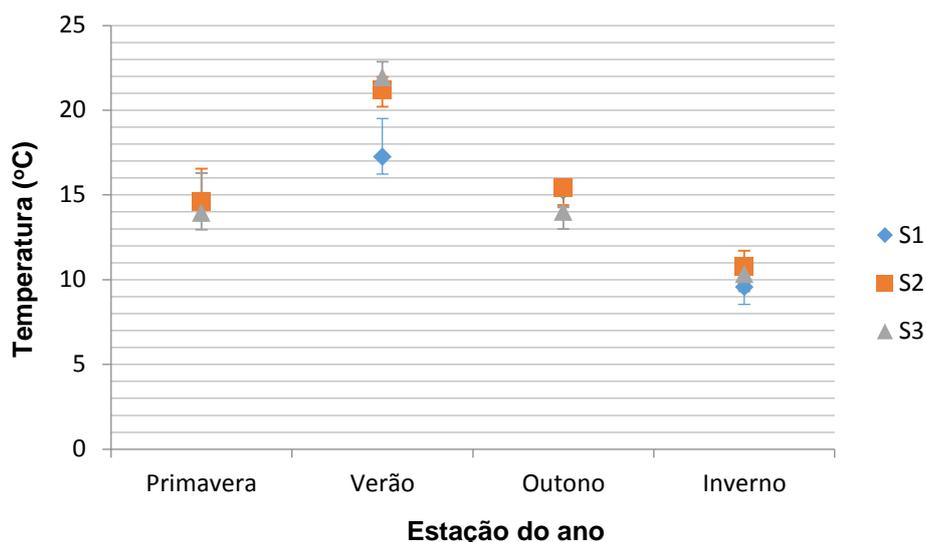
#### 4.1.1. Temperatura

A temperatura é um parâmetro de grande importância uma vez que tem grande influência nas reações químicas e bioquímicas que ocorrem na água, na solubilidade dos gases e na taxa de crescimento dos microrganismos. A temperatura superficial é influenciada por diversos factores de entre os quais a latitude, altitude, a sazonalidade, período do dia e profundidade.

No estuário do rio Minho, de acordo com a bibliografia consultada, a temperatura anual média é de 14°C para zonas a jusante e intermédias e de 9,5°C

para zonas mais afastadas do litoral, como consequência do afastamento litoral e da elevada altitude (PBH, 2001; Araújo, 2011).

Tendo em consideração o período do dia em que foi feita o registo dos parâmetros (período da tarde) os resultados obtidos para a variação da temperatura à superfície são representados na Figura 9.

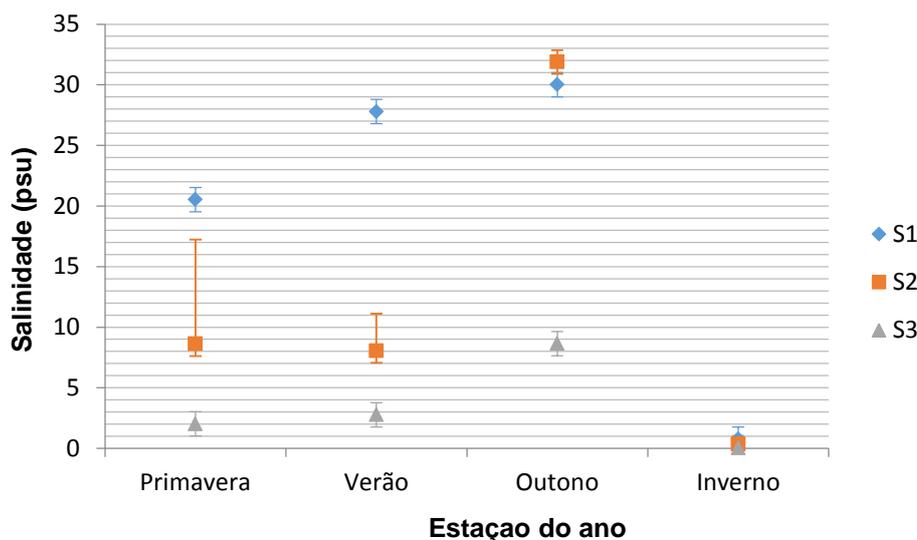


**Figura 9** - Média e desvio padrão da variação sazonal da temperatura (°C) ao longo dos três pontos de amostragem. S1 – Foz; S2 - Ferry; S3 - Sapal.

Os presentes resultados confirmam a tendência sazonal inerente a cada estação: máximos observados no verão e mínimos no inverno. Os valores de temperatura variaram não só durante as estações do ano mas também por pontos de amostragem. O valor mais elevado de temperatura foi registado no verão, no ponto de amostragem S3 (Sapal) com 21,93°C e no inverno foi registado o valor mais baixo, no ponto S1 (Foz) com 9,55°C, possivelmente associado ao predomínio da água do mar. As médias e desvios-padrão referentes aos valores registados para a temperatura são apresentados no Apêndice 1.

#### 4.1.2. Salinidade

De acordo com dados obtidos na literatura consultada, a salinidade do estuário do rio Minho varia de 0,1 a 34,5 (Araújo, 2011). Os resultados obtidos para os valores registados são apresentados na Figura 10.



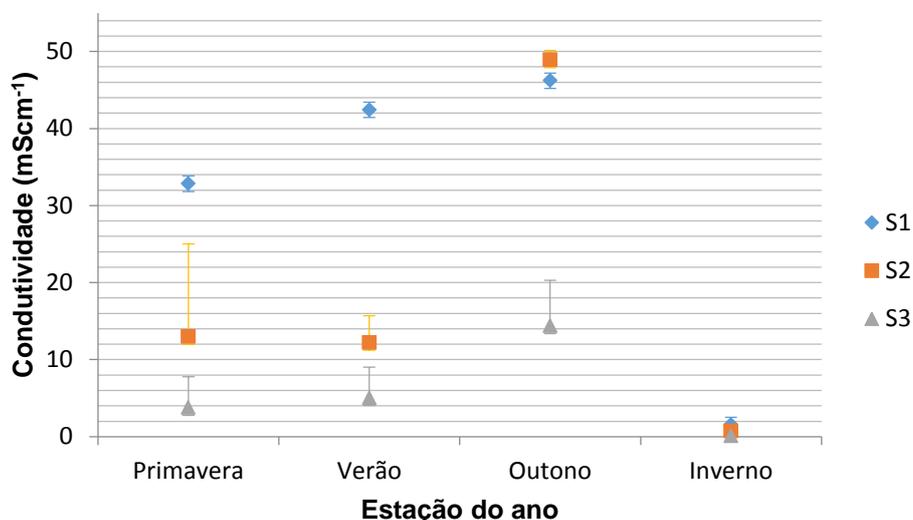
**Figura 10** - Média e desvio padrão da variação sazonal da salinidade (psu) ao longo dos três pontos de amostragem. S1 – Foz; S2 - Ferry; S3 - Sapal.

De acordo com os dados obtidos para a salinidade, verificou-se uma variação elevada ao longo dos diferentes pontos de amostragem, acompanhando a distância à foz. Os maiores valores referentes a estes parâmetros foram registados no Verão e Outono, sendo que é no Outono onde é evidenciada uma maior diferença entre pontos com valores mais elevados. Os valores mais baixos foram registados no Inverno. Assim, e atendendo aos valores encontrados, o valor mais elevado para a salinidade foi registado no Outono, no ponto de amostragem S2 com 31,90 psu e o valor mais baixo foi registado no Inverno, no ponto de amostragem S3 com 0,05 psu. Esta diferença de valores entre pontos de amostragem está relacionada com a distância dos pontos à Foz e entre estações do ano poderá estar relacionada com o caudal do rio. O caudal do rio é influenciado pela temperatura anual, sendo o Verão a estação na qual o caudal é menor.

#### 4.1.3. Condutividade

A condutividade é um parâmetro de medição da qualidade da água que permite conhecer o grau de mineralização de determinada massa de água. Existe uma forte relação entre a quantidade de minerais dissolvidos e a resistência que a condutividade oferece à passagem da corrente elétrica. Segundo esta relação, quanto maior for a quantidade de minerais dissolvidos maior será a condutividade presente. A condutividade por sua vez é influenciada pela temperatura e segue o mesmo padrão de variação da salinidade. A condutividade é expressa em micro

Siemens ( $\mu\text{Scm}^{-1}$ ), a 25°C de temperatura. Na Figura 11 são apresentados os valores registados para este parâmetro.

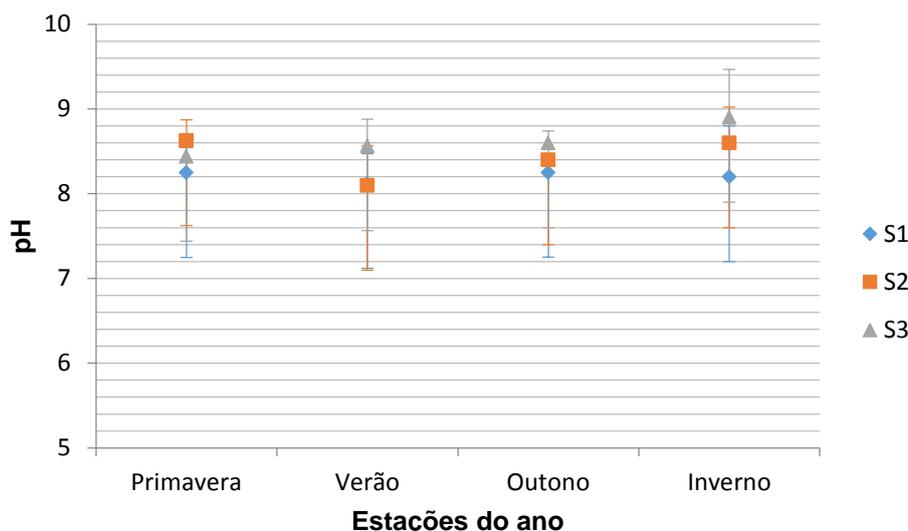


**Figura 11** - Média e desvio padrão da variação sazonal da condutividade ( $\text{mScm}^{-1}$ ) ao longo dos três pontos de amostragem. S1 – Foz; S2 - Ferry; S3 - Sapal.

Pela análise dos resultados verifica-se que a condutividade seguiu a tendência geral da salinidade com valores mais elevados no Verão e Outono, sendo no Outono registada a presença de valores mais elevados em todos os pontos de amostragem. O decréscimo da condutividade está associado com o afastamento dos pontos de amostragem à Foz. O valor mais elevado para este parâmetro foi registado no ponto S2 com  $48,9 \mu\text{Scm}^{-1}$  e o valor mais baixo foi registado no ponto

#### 4.1.4. Potencial de hidrogénio, pH

De acordo com os dados estatísticos consultados na bibliografia utilizada, o estuário do rio Minho apresenta valores de pH que podem variar entre 5,7 a 7,92 no canal principal e afluentes (Araújo, 2011) sendo esta variação alterada com a proximidade à Foz do rio Minho. Os valores encontrados para o pH são apresentados na Figura 12.



**Figura 12** - Média e desvio padrão da variação sazonal do pH ao longo dos três pontos de amostragem. S1 – Foz; S2 - Ferry; S3 - Sapal.

De acordo com os valores encontrados, o pH varia de um mínimo de 8,10 a 8,90. O menor valor de pH foi registado no ponto S2 e o maior valor registado no ponto S3. A diferença de valores encontrados com aqueles que foram consultados na bibliografia utilizada, pode estar relacionada com a proximidade dos pontos de amostragem deste estudo à foz.

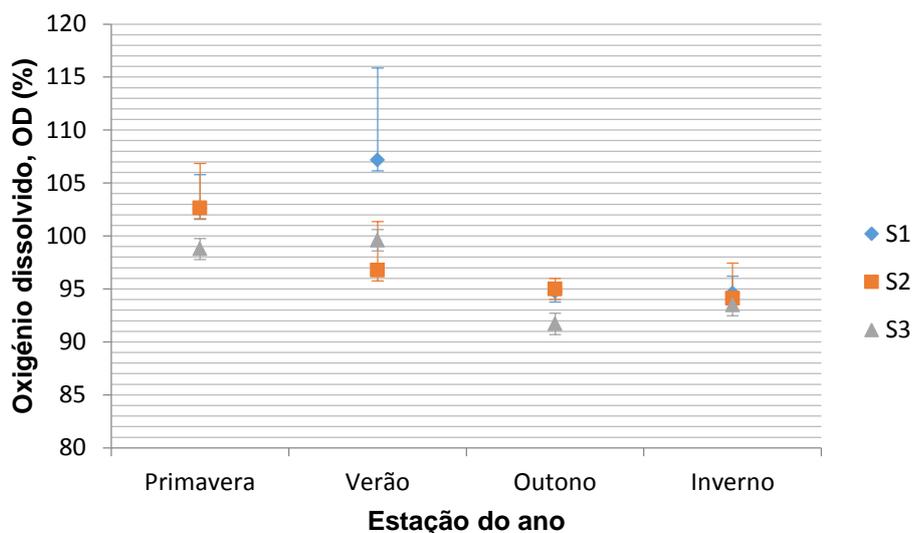
#### 4.1.5. Oxigénio Dissolvido, OD

No geral, todos os organismos aquáticos estão dependentes do oxigénio presente no meio para manter a atividade metabólica que lhes permite a produção de energia para o seu crescimento e reprodução (Sousa, 2001)

Num conjunto de gases presentes em águas naturais, a concentração de oxigénio ( $O_2$ ) e de dióxido de carbono ( $CO_2$ ) são as mais elevadas. Num ecossistema de transição, o oxigénio dissolvido pode tornar-se limitante. Este parâmetro é fundamental para a manutenção e sobrevivência das comunidades aquáticas aeróbicas. A solubilidade deste parâmetro é dependente de três fatores: pressão atmosférica, temperatura e salinidade da água. O teor de OD é inversamente proporcional à temperatura. Em termos biológicos, a % de OD é um indicador mais importante, do que concentração de OD, uma vez que nos indica se existem processos biológicos e/ou químicos que estejam a retirar o oxigénios das águas, colocando em risco não só a qualidade do mesmo como das espécies aquáticas.

De acordo com os valores publicados, o intervalo de variação da percentagem de OD no caudal principal do rio Minho é de 64,7 a 131 e o intervalo de variação para a concentração de OD no caudal principal é de 4,62 a 13,89 (Fidalgo e Barbosa, 1994; Fidalgo, 1998; Araújo, 2011). No entanto estes valores podem variar dependendo dos fatores acima referidos.

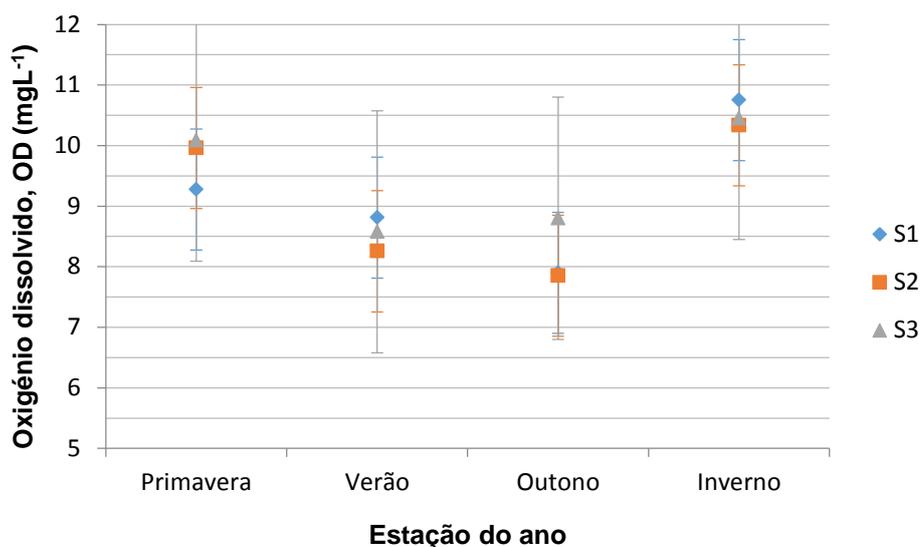
Na Figura 13 são apresentados os valores registados para a percentagem de OD presente no estuário do rio Minho.



**Figura 13** - Média e desvio padrão da variação sazonal do oxigénio dissolvido (%) ao longo dos três pontos de amostragem. S1 – Foz; S2 - Ferry; S3 - Sapal.

Os valores registados para a percentagem de OD denotam uma variação significativa ao longo dos três pontos de amostragem e estações do ano. Os valores mais elevados foram registados na Primavera. O valor mais elevado foi registado no ponto S2 com 102,64% e o valor mais baixo foi registado no ponto S3 com 91,70%

Na Figura 14 são apresentados os valores registados para a concentração de OD.



**Figura 14** - Média e desvio padrão da variação sazonal do oxigênio dissolvido ( $\text{mgL}^{-1}$ ) ao longo dos três pontos de amostragem. S1 – Foz; S2 - Ferry; S3 - Sapal.

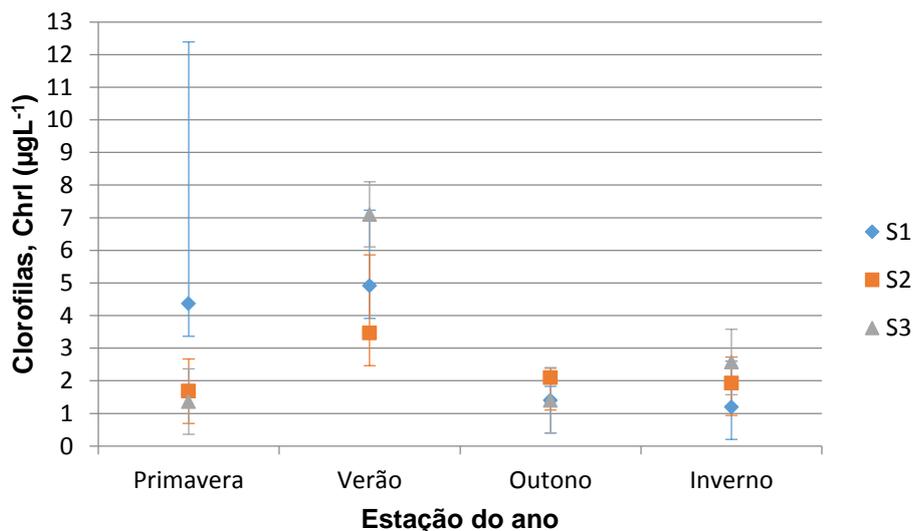
A tendência para valores mais elevados na Primavera mantém-se, tal como evidenciado para a %OD. Assim, o valor mais elevado para a concentração de OD foi registado no ponto de amostragem S2 com  $10,75 \text{ mgL}^{-1}$  e a valor mais baixo foi também registado no ponto S2 com  $7,90 \text{ mgL}^{-1}$ . Tendo em consideração os valores encontrados com o intervalo de variação anteriormente mencionado, tanto a % como a concentração de OD encontram-se dentro dos valores até à data reportados.

#### 4.1.6. Clorofilas, Chrl

O teor em clorofilas é um parâmetro indicador da produtividade primária, isto é, da presença de biomassa num determinado ecossistema aquático. A sua quantificação em ambientes aquáticos é de extrema importância uma vez que as diversas espécies de algas são responsáveis pelo processo de eutrofização, um fator indicador de poluição aquática em situações extremas.

A monitorização dos valores de clorofila em ambiente aquático apresenta como principal desvantagem o fato de ser muito dispendioso. De facto, a sonda de clorofilas utilizada neste estudo foi bastante dispendiosa mas permite determinar eficaz e rapidamente este parâmetro no meio.

Na Figura 15 são apresentados os valores registados para a concentração das clorofilas.



**Figura 15** - Média e desvio padrão da variação sazonal da concentração de clorofilas ( $\mu\text{gL}^{-1}$ ) ao longo dos três pontos de amostragem. S1 - Foz; S2 - Ferry; S3 - Sapal.

Apesar da concentração em clorofilas não apresentar diferenças significativas, apresentou valores mais elevados em estações do ano nas quais a temperatura foi também mais alta e por conseguinte caudal menor. Assim, o valor mais elevado para a concentração de clorofilas foi registado no ponto de amostragem S3 com  $7,10 \mu\text{gL}^{-1}$  e o valor mais baixo foi registado no ponto S1 com  $1,20 \mu\text{gL}^{-1}$ . O valor mais elevado para a concentração de clorofilas pode estar relacionado com uma situação de eutrofização local já que, fazendo uma análise geral do ponto S3, a estação do verão foi aquela que apresentou uma maior temperatura e menor quantidade de OD, quer em % quer em  $\text{mgL}^{-1}$ .

## 4.2. Compostos Disruptores endócrinos

Os dados obtidos para os níveis de concentração evidenciados nos três estuários em estudo são apresentados nas Tabelas 8, 9, 10 e 11.

Numa primeira etapa de discussão será avaliada a situação dos estuários em conjunto (Minho, Ave e Mondego), fazendo uma comparação acerca dos níveis detetados para os três compostos em estudo. Numa segunda fase, será feita uma análise em separado na qual, e para cada situação, será discutido o estado atual dos três estuários, reportando níveis já evidenciados noutros estudos nos mesmos estuários (Almeida *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2009c e 2013).

### 4.2.1. Concentrações em EDCs

Na Tabela 8 são apresentados os resultados obtidos para a média ( $\text{ngL}^{-1}$ ) e coeficiente de variação (%) de concentração dos três compostos em estudo nos estuários do Minho, Ave e Mondego.

**Tabela 8** - Média ( $\text{ngL}^{-1}$ ) e coeficiente de variação (%) para os valores de concentração dos três EDC's avaliados nos três estuários em estudo

Estuário	Composto [ $\text{ngL}^{-1}$ ]		
	E2	EE2	BPA
Minho	0.46 (37%) n=12	0.30 (91%) n=12	16.62 (125%) n=6
Ave	0.79 (56%) n=9	0.37 (94%) n=9	46.28 (45%) n=6
Mondego	0.54 (27%) n=6	0.14 (27%) n=6	62.26 (204%) n=6

Após uma análise cuidada da globalidade dos resultados obtidos é de notar que o composto com concentração mais elevada é o bisfenol A (BPA A), atingindo um máximo de concentração no estuário do rio Mondego ( $62,26 \pm 0,17 \text{ ngL}^{-1}$ ) (média  $\pm$  desvio-padrão)<sup>10</sup>. No mesmo estuário, é evidenciada a menor concentração, entre compostos, para o estrogénio sintético (17 $\beta$ -etinilestradiol, EE2) ( $0,14 \pm 0,04 \text{ ngL}^{-1}$ ).

Para os dois compostos estrogénicos, no geral, as concentrações evidenciadas entre estuários não apresentaram grande variação. Assim, no estuário do Minho e Mondego registou-se a menor concentração para o estrogénio sintético (EE2) e, no estuário do Ave registou-se a maior concentração para o estrogénio natural (estradiol, E2). Para o BPA, o nível atingido no estuário do rio Mondego é cerca de quatro vezes superior ao detetado no Minho, e menos de metade do valor da concentração detetada no Ave.

É contudo de notar que para o estuário do Ave apenas foi possível quantificar as amostras referentes a três estações do ano (primavera, verão e inverno), enquanto que, para o estuário do Mondego apenas foi possível quantificar as amostras referentes a duas estações do ano (primavera e inverno).

<sup>10</sup> O valor de desvio-padrão foi obtido recorrendo à fórmula  $Cv = \sigma/\mu$  na qual, o Cv se refere ao coeficiente de variação, o  $\sigma$  se refere ao desvio-padrão e o  $\mu$  se refere à média. Para efetuar o cálculo foram utilizados os valores reportados na Tabela 9.

#### 4.2.1.1. Estuário do rio Minho

Na Tabela 9 são apresentados os resultados obtidos para a média ( $\text{ngL}^{-1}$ ) e coeficiente de variação (%) de concentração dos três compostos em estudo no estuário do rio Minho. Na Tabela 9 é de salientar ainda que a disposição dos pontos de amostragem é feita de acordo com o nível decrescente de gradiente de salinidade.

**Tabela 9** – Média ( $\text{ngL}^{-1}$ ) e coeficiente de variação (%) sazonal para os valores de concentração dos três EDC's avaliados no estuário do rio Minho.

Estuário do rio Minho				
Estação do ano	Pontos de amostragem	Composto [ $\text{ngL}^{-1}$ ]		
		E2	EE2	BPA
primavera 2012	Foz	0.41 (4%)	0.64 (10%)	8.83 (11%)
	Ferry	0.35 (3%)	0.70 (7%)	1.84 (17%)
	Sapal	0.44 (3%)	0.90 (5%)	3.47 (3%)
	<b>Todos os locais</b>	0.40 (11%)	0.75 (18%)	4.71 (78%)
verão 2012	Foz	0.61 (16%)	0.17 (5%)	<i>nd</i>
	Ferry	0.67 (3%)	0.18 (11%)	<i>nd</i>
	Sapal	0.81 (8%)	0.20 (12%)	<i>nd</i>
	<b>Todos os locais</b>	0.70 (15%)	0.18 (8%)	<i>nd</i>
outono 2012	Foz	0.28 (2%)	0.13 (4%)	<i>nd</i>
	Ferry	0.53 (5%)	0.18 (9%)	<i>nd</i>
	Sapal	0.40 (3%)	0.15 (5%)	<i>nd</i>
	<b>Todos os locais</b>	0.40 (31%)	0.15 (16%)	<i>nd</i>
inverno 2013	Foz	0.40 (1%)	0.16 (6%)	57.81 (6%)
	Ferry	0.28 (9%)	0.11 (6%)	11.87 (2%)
	Sapal	0.30 (7%)	0.11 (2%)	15.90 (2%)
	<b>Todos os locais</b>	0.33 (20%)	0.13 (23%)	28.53 (89%)

*nd* – não disponível

Em cada local o coeficiente de variação (CV) é relativo à variabilidade entre duplicados. Em todos os locais o CV corresponde à variabilidade entre locais.

Fazendo uma pequena análise temporal dos valores de concentração encontrados, à primeira vista, o composto que mais se realça é o BPA que atinge

um máximo de concentração no inverno ( $57,81 \pm 3,47 \text{ ngL}^{-1}$ )<sup>11</sup>. Atendendo à estação do ano, seria de prever uma maior diluição dos compostos, e por conseguinte uma menor concentração dos compostos em estudo, devido ao aumento do caudal do rio, resultante da elevada precipitação nesta época. No que concerne aos níveis de estrogénios, embora as concentrações encontradas sejam relativamente baixas, valores pertencentes ao intervalo de variação de 0,11 a 0,90  $\text{ngL}^{-1}$ , não se pode descuidar o efeito que as mesmas podem acarretar a longo prazo. Esta ideia final também engloba o BPA.

Globalmente, e considerando os valores reportados por Rodrigues e colaboradores (2006) para o estrogénio sintético EE2, os valores do presente estudo sugerem que a contaminação por estrogénios sintéticos se manteve relativamente estável. Contudo, tendo em consideração o aumento de concentração observado, estes resultados sugerem a necessidade de um estudo mais detalhado para a avaliação da contaminação por estes compostos no estuário do rio Minho e seus potenciais efeitos nefastos em vertebrados e invertebrados deste ecossistema.

Importa referir também que a presença de BPA tinha já sido referenciada neste estuário, no ano de 2007 (Almeida *et al.*, 2007), mas apenas para uma matriz de sedimento, retirada da parte terminal deste estuário. No entanto, a concentração de BPA reportada por Almeida (2007) foi em níveis mais baixos do que aqueles que neste estudo foram evidenciados (0,1-0,6  $\text{ngL}^{-1}$ ). Estes valores, no entanto, são compreensíveis uma vez que a montante da foz do estuário do rio Minho existe uma grande área industrial, tanto na parte portuguesa (Pólo industrial de Vila Nova de Cerveira, freguesia de Campos), como na parte espanhola (Pólo industrial de Porriño e Ourense), podendo assim ser esta a fonte de contaminação através da qual a Bacia Hidrográfica do rio Minho é afetada (Antunes *et al.*, 2011).

As variações de concentração observadas, ao longo do ciclo anual, neste composto, sugerem a necessidade de uma monitorização para a presença deste composto e, eventualmente, uma monitorização que alerte para a necessidade de implementação de um projeto de mitigação das fontes de poluição industrial.

---

<sup>11</sup> O valor de desvio-padrão foi obtido recorrendo à fórmula  $Cv = \sigma/\mu$  na qual, o  $Cv$  se refere ao coeficiente de variação, o  $\sigma$  se refere ao desvio-padrão e o  $\mu$  se refere à média. Para efetuar o cálculo foram utilizados os valores reportados na Tabela 10.

#### 4.2.1.2. Estuário do rio Ave

Ao longo do tempo, várias têm sido as fontes de contaminação gerada na região da Bacia Hidrográfica do rio Ave. A descarga de efluentes não tratados, no geral urbanos e industriais, ao longo de longos anos, contribuiu para a diminuição da qualidade das águas deste ecossistema, de tal modo que as águas deste ecossistema foram declaradas como impróprias para consumo e, por vezes, até para contacto direto (MARETEC, 2013). Estudos prévios confirmam esta ideia dando a conhecer elevados níveis de poluição aquática patente nesta área (Rocha et al., 2013).

Na Tabela 10 são apresentados os resultados obtidos para a média (ngL-1) e coeficiente de variação (%) de concentração dos três compostos em estudo no estuário do rio Ave. É de salientar ainda que a disposição dos pontos de amostragem na Tabela 10 é feita tendo em consideração o gradiente de salinidade do maior para o menor.

**Tabela 10** - Média (ngL<sup>-1</sup>) e coeficiente de variação (%) sazonal para os valores de concentração dos três EDC's avaliados no estuário do rio Ave.

Estuário do rio Ave				
Estação do ano	Pontos de amostragem	Composto [ngL <sup>-1</sup> ]		
		E2	EE2	BPA
primavera 2012	Canal	0.90 (5%)	0.93 (4%)	59.68 (7%)
	Praia	0.96 (13%)	0.88 (13%)	19.34 (1%)
	Estaleiros	1.40 (4%)	0.69 (1%)	65.35 (0%)
	<b>Todos os locais</b>	1.09 (25%)	0.83 (15%)	48.12 (52%)
verão 2012	Canal	0.48 (6%)	0.16 (7%)	<i>nd</i>
	Praia	0.58 (3%)	0.18 (5%)	<i>nd</i>
	Estaleiros	1.56 (3%)	0.18 (10%)	<i>nd</i>
	<b>Todos os locais</b>	0.87 (68%)	0.17 (7%)	<i>nd</i>
inverno 2013	Canal	0.38 (4%)	0.11 (0%)	22.78 (9%)
	Praia	0.44 (14%)	0.12 (2%)	63.88 (12%)
	Estaleiros	0.43 (2%)	0.11 (11%)	46.63 (8%)
	<b>Todos os locais</b>	0.42 (8%)	0.11 (5%)	63.88 (46%)

*nd* – não disponível

Em cada local o coeficiente de variação (CV) é relativo à variabilidade entre duplicados. Em todos os locais o CV corresponde à variabilidade entre locais.

Tendo em consideração as informações acima referidas e os valores apresentados na Tabela 5, verifica-se, no geral, uma menor concentração dos níveis de compostos em relação ao verificado no passado (Rocha *et al.*, 2013). É de notar que, entre compostos, a menor concentração encontrada está relacionada com estrogénios naturais (E2) e sintéticos (EE2), com uma variação de concentração no intervalo de 0,11 a 1,56 ngL<sup>-1</sup> e que, em comparação com estes níveis, o BPA apresenta-se em concentrações muito mais elevadas, variação de concentração no intervalo de 19 a 70 ngL<sup>-1</sup>. Os valores aqui apresentados para o BPA estão dentro da mesma ordem de grandeza dos valores determinados por Rocha e colaboradores (2013). Salientar que os dados obtidos dizem respeito a pontos de amostragem não coincidentes com aqueles que foram considerados no presente estudo e que as amostras de água foram recolhidas no ano de 2010 nas mesmas estações do ano.

Importa referir que os níveis de concentração de estrogénios apresentados no presente estudo são mais baixos relativamente aos valores do estudo de 2013 (Rocha *et al.*, 2013) (ordem de grandeza inferior para os níveis de EE2 detetados no presente estudo).

A diferença de valores referentes aos níveis de E2 e EE2 pode estar relacionada com os investimentos no tratamento de efluentes que drenam para o Ave, inseridos no projeto de despoluição da Bacia do Ave. Importa referir ainda que, na atualidade, a monitorização do rio Ave é realizada por 11 estações de qualidade da água, 16 pontos de amostragem, 8 estações hidrométricas 20 estações meteorológicas (Oliveira, 2006).

#### 4.2.1.3. Estuário do rio Mondego

Atendendo à área envolvente do estuário do rio Mondego, bem como ao percurso realizado desde a nascente até à foz, nomeadamente a passagem por áreas agrícolas, rurais, urbanizadas e industrializadas, seria de esperar variações de valores de acordo com os pontos de amostragem.

Na Tabela 11 são apresentados os resultados obtidos para a média ( $\text{ngL}^{-1}$ ) e coeficiente de variação (%) de concentração dos três compostos em estudo no estuário do rio Mondego. Referir ainda que, a disposição dos pontos de amostragem na Tabela 11 é feita tendo em consideração o gradiente de salinidade do maior para o menor.

**Tabela 11** - Média (ngL<sup>-1</sup>) e coeficiente de variação (%) sazonal para os valores de concentração dos três EDC's avaliados no estuário do rio Mondego.

<b>Estuário do rio Mondego</b>				
<b>Estação do ano</b>	<b>Pontos de amostragem</b>	<b>Composto [ngL<sup>-1</sup>]</b>		
		<b>E2</b>	<b>EE2</b>	<b>BPA</b>
<b>primavera 2012</b>	Doca	0.59 (3%)	0.19 (3%)	321.48 (2%)
	Armazéns	0.51 (5%)	0.16 (10%)	9.09 (35%)
	Pranto	0.79 (2%)	0.18 (2%)	6.66 (1%)
	<b>Todos os locais</b>	0.63 (23%)	0.17 (9%)	112.41 (161%)
<b>inverno 2013</b>	Doca	0.35 (8%)	0.11 (1%)	17.57 (3%)
	Armazéns	0.46 (2%)	0.10 (5%)	8.70 (19%)
	Pranto	0.54 (3%)	0.12 (9%)	10.07 (6%)
	<b>Todos os locais</b>	0.45 (21%)	0.11 (9%)	11.45 (32%)

Em cada local o coeficiente de variação (CV) é relativo à variabilidade entre duplicados. Em todos os locais o CV corresponde à variabilidade entre locais.

Assim, e de acordo com valores apresentados na Tabela 11, verifica-se que, ao contrário do que acontece com o bisfenol A (BPA), não existe variação notável quanto aos níveis de concentração de estrogénios (E2 e EE2). Para os níveis de BPA, o máximo de concentração obtida foi detetada na Doca ( $321.48 \pm 6,43 \text{ ngL}^{-1}$ )<sup>12</sup> para ambas as estações (primavera e inverno) e nos restantes dois pontos (Armazéns e Pranto) a variação entre valores é pequena.

Fazendo uma análise geral dos pontos de amostragem, quanto aos níveis de cada composto, o BPA é aquele que maior valor de concentração obteve na média dos três locais sendo a primavera de maior referência para a sua presença ( $112,41 \pm 181 \text{ ngL}^{-1}$ ).

Comparando os valores aqui apresentados com os níveis de concentração reportados no estudo realizado por Ribeiro e colaboradores (2009c) verifica-se que, as concentrações para os estrogénios (E2 e EE2) mantêm-se baixas (inferiores a  $1,0 \text{ ngL}^{-1}$ ) ao passo que, a concentração do BPA apresenta-se como a mais elevada (superior a  $300 \text{ ngL}^{-1}$ ), o mesmo acontecendo com os valores encontrados

<sup>12</sup> O valor de desvio-padrão foi obtido recorrendo à fórmula  $Cv = \sigma/\mu$  na qual, o Cv se refere ao coeficiente de variação, o  $\sigma$  se refere ao desvio-padrão e o  $\mu$  se refere à média. Para efetuar o cálculo foram utilizados os valores reportados na Tabela 12.

no presente estudo. Importa ainda referir que, relativamente ao valor de concentração do BPA, que a concentração mais elevada encontrada neste estuário é mais baixa relativamente à encontrada que no ano de 2008 pelos autores ( $507 \text{ ngL}^{-1}$ ) para a mesma estação do ano. Esta situação pode estar relacionada com medidas de mitigação implementadas na área, de forma a minimizar os impactos que este composto pode ter não só nos ecossistemas envolventes como nos organismos.

#### **4.2.2. Variações sazonais**

Os resultados obtidos sugerem a existência de variações sazonais na contaminação dos três estuários (Minho, Ave e Mondego) pelos compostos em estudo, de acordo com as oscilações sazonais evidenciadas nos valores encontrados.

Em geral, no estuário do rio Minho as concentrações dos 3 compostos foram mais elevadas na primavera, apesar de não ter sido possível quantificar a concentração de BPA para as estações do verão e outono. Foi também na primavera que se observaram valores mais altos para estrogénios naturais (E2) e sintéticos (EE2) no estuário do Ave, enquanto que a concentração em BPA foi mais elevada no inverno. No estuário do rio Mondego, observou-se uma grande diferença de valores entre as estações da primavera e inverno, apresentando concentrações na primavera, uma vez mais, com valores mais elevados.

#### **4.2.3. Variações ao longo do gradiente de salinidade**

Tendo em consideração o gradiente de salinidade em cada ponto de amostragem nos três estuários em estudo, de um modo geral, os resultados sugerem diferenças de concentração entre os compostos utilizados.

Dada a variação sazonal observada nos parâmetros abióticos, incluindo salinidade, seria contudo importante a confirmação deste padrão de resultados utilizando para este efeito um maior número de pontos de amostragem, não só coincidentes com aqueles que foram tratados neste estudo mas distribuídos a montante da foz do rio Minho, e um maior número de réplicas por ponto de amostragem, de forma a ser possível a realização de uma análise estatística mais cuidada e adequada ao número de amostras em estudo.

## Capítulo 5. Conclusão e perspectivas futuras

---

No presente trabalho, é realçado o conhecimento sobre EDCs, sobre os seus efeitos em organismos aquáticos, sobre metodologias de quantificação e sobre os níveis existentes em ecossistemas estuarinos. Diversos compostos de origem natural e sintética funcionam como disruptores endócrinos. A crescente procura de novos fármacos e produtos úteis à sociedade moderna, nas mais diversas áreas de aplicação, sugere que outros compostos ainda não definidos como tal venham a ser descobertos, podendo atualmente ser considerados como “compostos emergentes”. Os EDCs têm no entanto em comum os efeitos nefastos que se repercutem ao nível da reprodução, seja por interferência direta no desenvolvimento das gónadas ou células reprodutoras, seja por influência no desenvolvimento de caracteres sexuais.

Embora existam já algumas referências principalmente a nível internacional, ainda é necessário aprofundar o conhecimento sobre esta temática, nomeadamente no que se refere a estuários nacionais. Para alguns ambientes salobros como o estuário do Tejo e Rias de Aveiro e Formosa, são poucos os trabalhos sobre a presença de EDCs. Este é também o caso do estuário do rio Minho, uma área de reconhecido elevado valor para a conservação da natureza. Para outros, como o Douro, há indicações de níveis preocupantes em alguns EDCs, níveis estes, bem mais elevados do que os registados em estuários internacionais (Ribeiro *et al.*, 2009a; Rocha *et al.*, 2012a).

Neste trabalho foram detetados e quantificados os níveis de três compostos disruptores endócrinos (17 $\beta$ -estradiol (E2), 17 $\beta$ -etinilestradiol (EE2) e bisfenol (BPA)) no estuário do Minho, onde trabalhos prévios sugeriam a necessidade de uma avaliação acerca da contaminação dos estuários em estudo por compostos disruptores endócrinos (Rodrigues *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2009c; Rocha *et al.*, 2013). Os valores obtidos não diferiram muito dos valores reportados nestes estudos utilizados como referência de comparação. No entanto, para nenhum dos três compostos em estudo, os valores obtidos no Minho se aproximaram dos valores máximos observados nos dois estuários de comparação (Ave e Mondego). No entanto, os valores observados neste estudo revelam a necessidade de análises futuras mais detalhadas para avaliar a evolução temporal desta contaminação, assim como seus efeitos nas espécies de vertebrados e invertebrados dos ecossistemas em estudo.

Para os três compostos, poderão estar associadas à sua presença fontes de contaminação dos mesmos que se não forem controladas com programas de monitorização podem acarretar, a longo prazo, consequências nefastas para as comunidades biológicas do ecossistema. Assim, e verificando-se a presença dos três compostos nos três estuários, inclusive no estuário do Minho, a natureza dos valores reportados pode advir de: (1) estrogénio natural (E2): zonas urbanas, ETARs e/ou zonas de descarga de esgotos próximas dos pontos de coleta das amostras; (2) estrogénio sintético (EE2): zonas urbanas, efluentes hospitalares, ETARs; (3) bisfenol A (BPA): zonas industriais próximas dos pontos de coleta.

A pressão urbana no estuário é geralmente relacionada com a densidade populacional na área envolvente e nas áreas a montante. Os estuários do Minho e do Mondego terão por isso uma menor pressão urbana, pelo que se poderia esperar uma menor concentração em estrogénios naturais, associados aos ciclos hormonais naturais. O bisfenol é um indicador generalizado da pressão industrial, já que é muito comum na produção de diversos compostos químicos. No Minho, a pressão industrial está mais patente na zona industrial da freguesia de Campos (a montante da foz) e do lado espanhol no polígono industrial de Porriño. No entanto, os níveis de concentração de BPA encontrados no Minho ( $16,62 \pm 20,78 \text{ ngL}^{-1}$ ) não atingem a mesma proporção detetada no Ave ( $46,28 \pm 20,83 \text{ ngL}^{-1}$ ) e Mondego ( $62,26 \pm 127,0 \text{ ngL}^{-1}$ ).

Dado que os valores máximos podem ser registados a montante ou na foz, a quantificação de EDCs deverá ser realizada ao longo do gradiente de salinidade. Adicionalmente, já que diferentes EDCs apresentam tendências sazonais variáveis entre os diversos estuários estudados até à data, não se deverá descurar o estudo sazonal das suas concentrações.

Em paralelo com este trabalho, o projeto INPACTAR inclui também a determinação da proporção de indivíduos que apresentam intersexualidade nas populações naturais de gamarídeos dos 3 estuários. Sendo assim, como principais perspectiva futuras, os níveis de EDCs aqui reportados e os que serão publicados num futuro próximo, poderão ser correlacionados com a expressão de intersexualidade na espécie *Echinogammarus marinus*. Para além deste caso de estudo, haverá no entanto outras espécies estuarinas sujeitas à influência de EDCs que poderão exprimir os seus efeitos. Como exemplo temos a feminização da papila urogenital no peixe *Pomatoschistus minutus* (Rodrigues *et al.*, 2006), um

pequeno caboz epibentónico muito abundante no estuário do Minho, que poderá ser um exemplo cuja investigação futura deveria abordar.

Tal como já foi referido anteriormente, a presença de compostos disruptores endócrinos em ambientes aquáticos afeta não só a qualidade do ecossistema como também aporta consequências nefastas para as comunidades biológicas. A presença difundida destes compostos, em ecossistemas aquáticos, tem promovido a implementação de programas de monitorização cujo objetivo passe pela tentativa conjunta de diminuir os impactos desencadeados pela presença destes compostos nos ecossistemas aquáticos.

Muitos foram os estudos internacionais que, até à data, foram publicados sendo alguns desses reportados neste trabalho. Nos mesmos, são apresentadas diversos níveis de concentração de EDCs associados aos mais diversos efeitos que estes compostos promovem nos organismos. Contrariamente, poucos são os estudos nacionais nos quais é feita uma análise acerca da presença de EDCs, em meio aquático, assim como que implicações poderão ter nestes ecossistemas. Não havendo, até à data, mais estudos que possam ser utilizados como via de comparação com o presente estudo, no que concerne aos valores, não só destes três compostos em estudo, como também de outros EDCs, é necessária uma maior amplitude de testes nos quais seja feita a avaliação destes compostos nestes e em outros estuários portugueses.

## Referências Bibliográficas

---

Ahmed, A. - Mann Whitney U-test Calculator [Em linha]. atual.2013 [consult. 1 Fev. 2014]. Disponível em WWW: <<http://scistatcalc.blogspot.pt/2013/10/mann-whitney-u-test-calculator-work-in.html>>.

Almeida, C., Seródio, P., Florencio, M.H. e Nogueira, J.M.F. 2007. New strategies to screen for endocrine-disrupting chemicals in the Portuguese marine environment utilizing large volume injection-capillary gas chromatography-mass spectrometry combined with retention time locking libraries (LVI-GC-MS-RTL). *Analytical and Bioanalysis Chemistry* 387 : 2569-2583.

Alves, A.M. 1996. Causas e processos da dinâmica sedimentar na evolução actual do litoral do Alto Minho. Tese de Doutoramento. Braga: Universidade do Minho, 442 p.

Antunes C., Araújo M.J., Braga C., Roleira A. 2011. Plano de gestão da enguia europeia (*Anguilla anguilla*) no troço internacional do rio Minho (TIRM). Projecto Miño-Minho. Relatório do projeto. Porto/Santiago de Compostela: CIIMAR & Universidade de Santiago de Compostela.

APA. 2012. Plano de gestão da região hidrográfica do Minho e Lima RH1 - Relatório Técnico – Comissão Europeia. Agência Portuguesa do Ambiente. *In* “Relatório Final do PGRH-Minho e Lima”.

Araújo, M.J.F.S. 2011. Ecologia e composição nutricional da lampreia-marinha (*Petromyzon marinus*, L.) no rio Minho internacional. Tese de Mestrado. Porto: Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar. 141 p.

Associação de Municípios do Vale do Minho. 2011. Atlas das Paisagens do Vale do Minho. [Em linha]. [Valença]: Associação de Municípios do Vale do Minho. [consultado em 2013-02-18]. Disponível em WWW: <[http://www.valedominhodigital.pt/portal/page/portal/Portal\\_Regional/Template%20Portal%20Regional%20novo%20header%20Galeria/atlas\\_do\\_minho.pdf](http://www.valedominhodigital.pt/portal/page/portal/Portal_Regional/Template%20Portal%20Regional%20novo%20header%20Galeria/atlas_do_minho.pdf)>.

Atkinson, S., Atkinson, M.J. e Tarrant, A.M. 2003. Estrogens from Sewage in Coastal marine environments. *Environmental Health Perspectives*.111 (4) : 531-535.

Avery, L. - Mann-Whitney U Test [Em linha]. atual.1997 [consult. 1 Fev. 2014]. Disponível em WWW: <<http://elegans.som.vcu.edu/~leon/stats/utest.html>>.

Barroso, C.M., Moreira, M.H., e Bebianno, M.J. 2002. Imposex, female sterility and organotin contamination of the prosobranch *Nassarius reticulatus* from the Portuguese coast. *Marine Ecology Progress Series*. 230 : 127-135.

Belgiorno, V.; Rizzo, L.; Fatta, D.; Rocca, C.D.; Lofrano, G.; Nikolaou, A.; Naddeo, V.; Meric, S. 2007. Review on endocrine disrupting - emerging compounds in urban wastewater: Occurrence and removal by Photocatalysis and Ultrasonic irradiation for wastewater reuse. *Desalination*. 215 : 166-176.

Bergman, A., Heindel, J.J., Jobling, S., Kidd, K.A. e Zoeller, R.T. 2012. State of the science of endocrine disrupting chemicals – summary for decision – makers. United Nations Environment Programme (UNEP) and the World Health Organization (WHO). ISBN: 978-92-807-3274-0 (UNEP).

Bila, D.M. e Dezotti, M. 2007. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova*. 30 (3) : 651-666.

Borrirukwisitsak, S., Keenan, H.E. e Gauchotte-Lindsay, C. 2012. Effects of Salinity, pH and Temperature on the Octanol-Water Partition Coefficient of Bisphenol-A. *International Journal of Environmental Science and Development*. 3 : 460-464.

Boxall, A.B.A. 2012. New and Emerging Water Pollutants arising from Agriculture. United Kingdom: University of York. OECD Report.

Burkhardt-Holm, P. 2010. Endocrine Disruptors and Water Quality: A State-of-the-Art Review. *International Journal of Water Resources Development*. 26 (3) : 477-493.

Caliman, F.A. e Gavrilesco, M. 2009. Pharmaceuticals, Personal Care Products and Endocrine Disrupting Agents in the Environment – A Review. *Clean-journal*. 37 (4-5) : 277–303.

Campos, J.M.B. 2011. Detecção e quantificação de fármacos e disruptores endócrinos na urina humana durante o processo de estocagem com vistas ao uso agrícola. Tese de Mestrado. Brasil: Universidade Federal do Espírito Santo, 107 p.

Cargouet, M., Perdiz, D., Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S. e Levi, Y. 2004. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *The Science of the Total Environment*. 324 (1) : 55-66.

- Carson R. 1962. Silent Spring. Boston: Houghton Mifflin: Mariner Books.
- Carvalho, A.R.M. 2012. Monitorização de Desreguladores Endócrinos em águas de rede e águas residuais por SPE-UPLC-ESI-MS/MS: Empresa Portuguesa das Águas Livres (EPAL). Tese de Mestrado. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, 103 p.
- CCE. 2001. Estratégia comunitária em matéria de desreguladores endócrinos: substâncias suspeitas de interferir com os sistemas hormonais dos seres humanos e dos animais. Relatório de progresso sobre a comunicação COM (1999) 706. Comissão das Comunidades Europeias. Bruxelas.
- Céspedes, R., Lacorte, S., Raldúa, D., Ginebreda, A., Barceló, D. e Piña, B. 2005. Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat river basin (Catalonia, NE Spain). Chemosphere. 61 : 1710-1719.
- Chambel, J.H.M. 2011. Contribuição para o estudo da remoção em ETAR de 17 $\beta$ -estradiol e de 17 $\alpha$ -etinilestradiol no tratamento biológico. Tese de Mestrado. Lisboa: Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 105 p.
- Cirja, M., Ivashechkin, P., Schäffer, A., Corvini, P.F.X. 2008. Factors affecting the removal of organic micropollutants from wastewater in conventional treatment plants (CTP) and membrane bioreactors (MBR). Environmental Science Biotechnology. 7 : 61-78.
- Clotfelter, E.D., Bell, A.M.; Levering, K.R. 2004. The role of animal behaviour in the study of endocrine - disruption chemicals. Animal Behaviour. 68 (4) : 665-676.
- Colborn, T., Dumanoski, D. e Myers, J.P. 1996. *Our Stolen Future: Are We Threatening Our Fertility, Intelligence, and Survival? A Scientific Detective Story*. New York:Dutton 306 p.
- Colborn, T., Saal, F.S.v. e Soto, A.M. 1993. Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans. Environmental Health Perspectives. 101 (5) : 378-84.
- Costa-Dias, S., Freitas, V., Sousa, R. e Antunes, C. 2010a. Factors influencing epibenthic assemblages in the Minho Estuary (NW Iberian Peninsula). Marine Pollution Bulletin. 21 : 240–246.

Costa-Dias, S., Sousa, R. e Antunes, C. 2010b. Ecological quality assessment of the lower Lima Estuary. *Marine Pollution Bulletin*. 61:(4-6) : 234-239.

Cousins, I.T.; Staples, C.A.; Klecka, G.M. e Mackay, D. 2002. A Multimedia Assessment of the Environmental Fate of Bisphenol A. *Human and Ecological Risk Assessment*. 8 (5) : 1107-1135.

EC. 1999. Community Strategy for Endocrine Disrupters a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. European Commission. Communication from the Commission to the Council and the European Parliament. COM 706 final. Brussels, 31 pp.

Fenlon, K.A., Johnson, A.C.; Tyler, C.R., Hill, E.M. 2010. Gas-liquid chromatography-tandem mass spectrometry methodology for the quantitation of estrogenic contaminants in bile of fish exposed to wastewater treatment works effluents and from wild populations. *Journal of Chromatography A*. 1217 : 112-118.

Ferreira, S.M., Pardal, M.A., Lillebø, A.I., Cardoso, P.G., Marques, J.C. 2004. Population dynamics of *Cyathura carinata* (Isopoda) in a eutrophic temperate estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 61 : 669-677.

Fidalgo, M.L, Barbosa, I. 1994. Estuário do Minho: Principais características das suas águas. In 4ª Conferência Nacional sobre a qualidade do ambiente. Abril, 6-8, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa 1994, 133-137.

Fidalgo, M.L. 1998. Contribution to the ecological characterization of the river Minho estuary (Northern Portugal). *Verhandlungen des Internationalen. Verein Limnologie*. 28 : 1448-1451.

Filby, A.L., Neuparth, T., Thorpe, K.L., Owen, R., Galloway, T.S. e Tyler, C.R. 2007. Health Impacts of Estrogens in the Environment, Considering Complex Mixture Effects. *Environmental Health Perspectives*. 115 : 1704-1710.

Gomes, T., Gonzalez-Rey, M., Bebianno, M.J. 2009. Incidence of intersex in male clams *Scrobicularia plana* in the Guadiana Estuary (Portugal). *Ecotoxicology*. 18 : 1104-1109.

Gray, M.A. e Metcalfe, C.D. 1997. Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol. *Environmental Toxicology Chemistry*. 16 (5) : 1082-1086.

Grilo, T.F., Cardoso, P.G., Dolbeth, M., Bordalo, M.D., Pardal, M.A. 2011. Effects of extreme climate events on the macrobenthic communities' structure and functioning of a temperate estuary. *Marine Pollution Bulletin*. 62 : 303-311.

Heberer, T. 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters*. 131 (1-2) : 5-17.

Helland, J. 2006. Endocrine disrupters as emerging contaminants in wastewater. House Research Department, 4 p.

Hemmer, M.J., Hemmer, B.L., Bowman, C.J., Kroll, K.J., Folmar, L.C., Marcovich, D., Hoglund, M.D. e Denslow, N.D. 2001. Effects of p-nonylphenol, methoxychlor, e endosulfan on vitellogenin induction and expression in sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Environmental Toxicology Chemistry*. 20 (2) : 336-343.

Henriques, M.L.G.S. 2008. Hormonas naturais e de síntese, bisfenol A, octilfenol e nonilfenol em águas para consumo humano: optimização do método de análise por SPE-LC-ESI-MS/MS. Tese de Mestrado. Lisboa: Faculdade de farmácia. Universidade de Lisboa, 143 p.

Hibma, A., Stive, M.J.F. e Wang, Z.B. 2004. Estuarine morphodynamics. *Coastal Engineering*. 51 (8-9) : 765-778.

INAG, 2001. Plano de Bacia Hidrográfica do rio Minho – Relatório Final. INAG, Lisboa, 454 p.

Janex-Habibi, M., Huyard, A., Esperanza, M., Bruchet, A. 2009. Reduction of endocrine disruptor emissions in the environment: The benefit of wastewater treatment. *Water Research*. 43 : 1565-1576.

Jobling, S., Beresford, N., Nolan, M., Rodgers-Gray, T., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., e Tyler, C.R. 2002. Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents. *Biology of Reproduction*. 66 (2) : 272-81.

Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G. e Sumpter, J.P. 1998. Widespread Sexual Disruption in Wild Fish. *Environmental Science & Technology*. 32 (17) : 2498-2506.

Jonkers, N., Sousa, A., Galante-Oliveira, S., Barroso, C.M., Kohler, H.P.E. e Giger, W. 2010. Occurrence and sources of selected phenolic endocrine disruptors in Ria de Aveiro, Portugal. *Environmental Science Pollution Research*. 17 : 834-843.

Khanal, S.K., Xie, B., Thompson, M.L., Sung, S., Ong, Say-Kee e Leeuwen, J.v. 2006. Fate, Transport, and Biodegradation of Natural Estrogens in the Environment and Engineered Systems. *Environmental Science & Technology*. 40 (21) : 6537-6546.

Kime, D.E. 1999. A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction. *Science Total Environments*. 225 : 3-11.

Kortenkamp, A., Martin, O., Faust, M., Evans, R., McKinalay, R., Orton, F. e Rosivatz, E. 2011. State of the Art assessment of endocrine disruptors – Final Report. European Commission, DG Environment. 1-135.

Kudlak, B. e Namiesnik, J. 2008. Environmental fate of Endocrine Disrupting Compounds – Analytical Problems and Challenges. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 38 : 242-258.

Kummerer, K. 2009. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management*. 90 : 2354-2366.

Larson, D.G.J., Erci, M.A., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A.H., Olsson, P.E. e Forlin, L. 1999. Ethinyloestradiol – na undesired fish contraceptive?. *Aquatic Toxicology*. 45 : 91-97.

Lemos, M.F.L. 2009. Disrupção endócrina no isópode terrestre *Porcellio scaber*. Tese de Doutoramento. Aveiro: Universidade de Aveiro, 152 p.

Lintelmann, J., Katayama, A., Kurihara, N., Shore, L. e Wenzel, A. 2003. Endocrine disruptors in the environment. *Pure and Applied Chemistry*. 75 (5) : 631–681.

Little, C. 2000. *The Biology of Soft Shores and Estuaries: Biology of Habitats*. Nova Iorque: Oxford University *In Press*. ISBN 978-0-19-850426-9.

Lobo, F.M.S. 2012. Gestão Integrada da Zona Estuarina do Rio Minho, no contexto da Implementação da DQA. Tese de Mestrado. Porto: Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 137 p.

Lubick, N. 2010. Drugs in the Environment: Do Pharmaceutical Take-Back Programs Make a Difference? *Environmental Health Perspectives*. 118 (5) : 210-214.

Lyra, F.J.P.C.F. 2007. Caracterização da Comunidade de Macroinvertebrados Bentónicos do Estuário do Rio Minho – Sua Relação com a Distribuição de Poluentes no Sedimento. Tese de Mestrado. Porto: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Madureira, T.V., Rocha, M.J., Cruzeiro, C., Galante, M.H., Monteiro, R.A.F., Rocha, E. 2011. The toxicity potencial of pharmaceuticals found in the Douro River estuary (Portugal): Assessing impacts on gonadal maturation with a histopathological and stereological study of zebrafish ovary and testis after sub-acute exposures. *Aquatic Toxicology*. 105 : 292-299.

Maia-Mendes, M.C.V. 2007. Estrutura da comunidade de macroinvertebrados bentónicos do estuário do rio Minho. Tese de Mestrado. Porto: Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), 94 p.

MARETEC. 2013. Descrição – Mondego [Em linha]. Disponível em WWW: <[http://maretec.mohid.com/Estuarios/MenuEstuarios/Descricricao\\_Mondego.htm](http://maretec.mohid.com/Estuarios/MenuEstuarios/Descricricao_Mondego.htm)>.

Markey, C.M., Rubin, B.S., Soto, A.M. e Sonnenschein, C. 2003. Endocrine disruptors: from Wingspread to environmental developmental biology. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 83 : 235-244.

Martins, R.J.E. 2004. Acumulação e libertação de metais pesados por briófitas aquáticas. Tese de Doutoramento. Porto: Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 641 p.

Maurício, R., Diniz, M., Petrovic, M., Amaral, L., Peres, I., Barceló, D. e Santana, F. A characterization of selected endocrine disruptor compounds in a portuguese wastewater treatment plant. 2006. *Environmental Monitoring and Assessment*. 118 : 75-87.

McMaster, Marvin. 2008. GC/MS: A Practical User's Guide. 2ªed. Nova Jérсия: John Wiley & Sons, Inc. ISBN 978-0-470-10163-6.

Meire, P., Ysebaert, T., Van Damme, S., Van den Bergh, E., Maris, T. e Struyf. E. 2005. The Scheldt estuary: a description of a changing ecosystem. *Hydrobiology*. 540 : 1-11.

Mills, L.J. e Chichester, C. 2005. Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Science of the Total Environment*. 343 : 1-34.

Mompelat, S., Bot, B.L. e Thomas, O. 2009. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environment International*. 35 : 803-814.

Nagpal, N.K., e Meays, C.L. 2009. Water Quality Guidelines for Pharmaceutically-active-Compounds (PhACs): 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) 1-27. Science and Information Branch Water Stewardship Division Ministry of Environment. 1-27.

Nogueira, J. M. F. 1999. Desreguladores Endócrinos: Efeitos Adversos e Estratégias para a Monitorização dos Sistemas Aquáticos. Lisboa: Departamento de Química, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. 65-71.

Noppe, H., Wasch, K., Poelmans, S., Van Hoof, N.,Verslycke, T., Janssen, C.R. e De Brabander, H.F. 2005. Development and Validation of na analytical method for detection of estrogens in water. *Analytical Bioanalytical Chemistry*. 382 : 91-98.

Oehlmann, J. e Oehlmann, U. 2003. Endocrine disruption in Invertebrates (Topic 4.2). *Pure and Applied Chemistry*. 75 : 2207-2218.

Oliveira, R.E.S. 2006. Construção de um sistema de indicadores da qualidade das águas superficiais numa bacia hidrográfica. Tese de Mestrado. Braga: Universidade do Minho, 237 p.

PBH. 2001. Plano de Bacia Hidrográfica do Rio Minho, Relatório Final, Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território, Instituto da Água, I.P.

Picanço, T.P.C. 2007. Caracterização da macrofauna bentónica do sapal do rio Minho, Portugal. Tese de Mestrado. Porto: Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), 98 p.

Pinheiro, A.J.G. 1998. Caracterização do comportamento bacteriano do estuário do rio Minho com base em dados da sua culturabilidade e de epifluorescência. Tese de Mestrado. Porto: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 123 p.

Plant, J.A., Korre, A., Reeder, S., Smith, B. e Voulvoulis, N. 2005. Chemicals in the environment: implications for global sustainability. *Applied Earth Science (Trans. Inst. Min. Metall. B)*. 114 : 65-97.

Porte, C., Janer, G., Lorusso, L.C., Ortiz - Zarragoitia, M., Cajaraville, M.P., Fossi, M.C. e Canesi, L. 2006. Endocrine disruptors in marine organisms: Approaches and perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 143 : 303-315.

Pritchard, D.W. 1967. What is an Estuary: Physical Viewpoint. Washington D.C.: American Association for the Advancement of Science. 83 : 3-5.

Quirós, L., Céspedes, R., Lacorte, S., Viana, P., Raldúa, D., Barceló, D. e Piña, B. 2005. Detection and evaluation of endocrine-disruption activity in water samples from Portuguese rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24 (2) : 389-395.

Ribeiro, C. Pardal, M. Â., Tiritan, M. E., Rocha, E. Margalho, R.M., e Rocha, M.J. 2009b. Spatial distribution and quantification of endocrine-disrupting chemicals in Sado River estuary, Portugal. *Environmental Monitoring and Assessment*. 159 (1-4) : 415-427.

Ribeiro, C., Pardal, M. A., Martinho, F., Margalho, R., Tiritan, M. E., Rocha, E. e Rocha, M. J. 2009c. Distribution of endocrine disruptors in the Mondego River estuary, Portugal. *Environmental Monitoring and Assessment*. 149 (1-4) : 183-193.

Ribeiro, C., Tiritan, M.E., Rocha, E. e Rocha, M.J. 2007. Development and validation of a HPLC-DAD for determination of several endocrine disrupting compounds in estuarine water. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 30 : 2729-2746.

Ribeiro, C., Tiritan, M.E., Rocha, E. e Rocha, M.J. 2009a. Seasonal and spatial distribution of several endocrine-disrupting compounds in the Douro River Estuary, Portugal. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 56 (1) : 1-11.

Richardson, M.L. e Bowron, J.M. 1985. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 37 (1) : 1-12.

- Rocha, M.J., Cruzeiro, C. e Rocha, E. 2013. Quantification of 17 endocrine disruptor compounds and their spatial and seasonal distribution in Iberian Ave river and its coastline. *Toxicological & Environmental Chemistry*. 95 (3) : 386-399.
- Rocha, M.J., Cruzeiro, C., Ferreira, C. e Rocha, E. 2012a. Occurrence of endocrine disruptor compounds in the estuary of the Iberian Douro River and nearby Porto Coast (NW Portugal). *Toxicological & Environmental Chemistry*. 94 (2) : 252-261.
- Rocha, M.J., Ribeiro, M., Ribeiro, C., Couto, C., Cruzeiro, C. e Rocha, E. 2012b. Endocrine disruptors in Leça River and nearby Porto Coast (NW Portugal): presence of estrogenic compounds and hypoxic conditions. *Toxicological and Environmental Chemistry*. 94 (2) : 262-274.
- Rodrigues, P., Reis-Henriques, M.A., Campos, J. e Santos, M.M. 2006. Urogenital papilla feminization in male *Pomatoschistus minutus* from two estuaries in northwestern Iberian Peninsula. *Marine Environmental Research*. 62 : 8258-8262.
- Santos, M.M., Vieira, N., Reis-Henriques, M.A., Santos, A.M., Gomez-Ariza, J.L., Giraldez, I. e Hallers-Tjabbes, C.C.t. 2004. Imposex and butyltin contamination off the Oporto Coast (NW Portugal): a possible effect of the discharge of dredged material. *Environmental International*. 30 : 793-798.
- Segner, H., Caroll, K., Fenske, M., Janssen, C.R., Maack, G., Pascoe, D., Schäfers, C., Vandenbergh, G.F., Watts, M. e Wenzel, A. 2003. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 54 (3) : 302-314.
- Shore, L.S., Gureviyz, M. e Shemesh, M. 1993. Estrogen as an Environmental Pollutant. *Environmental Contamination and Toxicology*. 51 : 361-366.
- Silva, C.P., Lima, D.L.D., Schneider, R.J., Otero, M. e Esteves, V.I. 2013. Development of ELISA methodologies for the direct determination of 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in complex aqueous matrices. *Journal of Environmental Management*. 124 : 121-127.
- Silva, P.V.M.P. 2011a. Efeitos combinados de desreguladores endócrinos em *Daphnia magna*. Tese de Mestrado. Aveiro: Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, 53 p.

Silva, R.M.B. 2011b. Avaliação do efeito do Estuário do Ave na qualidade das águas balneares do concelho de Vila do Conde. Tese de Mestrado. Porto: Universidade Fernando Pessoa, 92 p.

SNIRH. 2014. Bacia Hidrográfica do Minho [Em linha]. [consult. 21 Mar. 2013]. Disponível em WWW:<<http://snirh.pt/index.php?idMain=4&idItem=2&idSubtem=2&bacia=Minho>>.

Snow, D.D., Bartelt-Hunt, S.L., Saunders, S.E., Cassada, D.A. 2009. Detection, Occurrence, and Fate of Emerging Contaminants in Agricultural Environments. *Water Environment Research*. 81 (10) : 941-958.

Sohoni, P., Tyler, C.R., Hurd, K., Caunter, J., Hetheridge, M., Williams, T., Woods, C., Evans, M., Toy, R., Gargas, M., e Sumpter, J.P. 2001. Reproductive effects of long-term exposure to bisphenol-A in the fathead minnow (*Pimphales promelas*). *Environmental Science Technology*. 35 :14 2917-2925.

Sosa-Ferrera, Z., Mahugo-Santana, C. e Santana-Rodrigues, J.J. 2013. Analytical Methodologies for the Determination of Endocrine Disruption Compounds in Biological and Environmental Samples. *BioMed Research International*. 2013 : 23 p.

Sousa, A., Schönenberger, R., Jonkers, N., Suter, M.J.F., Tanabe, S. e Barroso, C.M. 2010. Chemical and Biological Characterization of Estrogenicity in Effluents from WWTPs in Ria de Aveiro (NW Portugal). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 58 : 1-8.

Sousa, A.C.A. 2009. Níveis e Efeitos Biológicos de Disruptores Endócrinos na Costa Portuguesa. Tese de Doutoramento. Aveiro: Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, 208 p.

Sousa, E.R. 2001. Noções sobre a qualidade da água – Parâmetros de caracterização de uma massa de água. Estágio de Licenciatura. Lisboa: Engenharia Civil e Arquitectura, 29 p.

Sousa, R., Dias, S., Freitas, V. e Antunes, C. 2008. Subtidal macrozoobenthic assemblages along the River Minho estuarine gradient (north-west Iberian Peninsula). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. 18 : 1063-1077.

Sumpter, J.P. e Jobling, S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environment Health Perspectives*. 103 : 173 -178.

Sumpter, J.P.1998. Xenoendocrine disrupters - environmental impacts. *Toxicology Letters*. 102 : 337-342.

Ternes, T.A., Andersen, H., Gilberg, D. E Bonerz, M. 2002. Determination of Estrogens in Sludge and Sediments by Liquid Extraction and GC/MS/MS. *Analytical Chemistry*. 74 :14 3498-3504.

Tylingo, K.K., Namiesnik, J. e Górecki, T. 2010. Determination of Estrogenic Endocrine Disruptors in Environmental Samples – A Review of Chromatography Methods. *Critical Review in Analytical Chemistry*. 40 : 194-201.

Urbatzka, R., Rocha, E., Reis, B., Cruzeiro, C., Monteiro, R.A.F., Rocha, M.J. 2012. Effects of ethinylestradiol and of an environmentally relevant mixture of xenoestrogens on steroidogenic gene expression and specific transcription factors in zebrafish. *Environmental Pollution*. 164 : 28-35.

USEPA. 1997. Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis. U.S. Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum, Washington, DC, 630/R-96/012.

USEPA. 2012. Emerging Contaminant – Nanomaterials. Environmental Protection Agency. EPA 505-F-11-009, 8 p.

Van den Belt, K., Verheyen, R. e Witters, H. 2001. Reproductive effects of Ethinylestradiol and 4t-Octylphenol on the Zebrafish (*Danio rerio*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 41 : 458-467.

Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs, D.R., Lee, Jr., Duk-Hee, S.T., Soto, A.M., Saal, F.S.v., Welshons, W.V., Zoeller, R. T., Myers, J.P. 2012. Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Reviews*. 33 (3) : 1-78.

Vethaak, A.D., Lahr, J., Schrap, S.M., Belfroid, A.C., Rijs, G.B.J., Gerritsen, A., De Boer, J., Bulder, A.S., Guy C.M., Grinwis, G.C.M., Raoul V. Kuiper, R.V., Juliette Legler, J., Tinka A.J., Murk, T.A.J., Peijnenburg, W., Verhaar, H.J.M. e De Voogt,

Pim. 2005. An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere*. 59 : 511-524.

White, R., Jobling, S., Hoare, S.A., Sumpter, J.P. e Parker, M.G. 1994. Environmentally Persistent Alkylphenolic Compounds Are Estrogenic. *Endocrinology*. 135 (1) : 175-182.

WHO. 2002. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. World Health Organization. *In: International Programme on Chemical Safety*. Geneva, Switzerland

Woodling, J.D., Lopez, E.M., Maldonado, T.A., Norris, D.O. e Vадja, A. M. 2006. Intersex and other reproductive disruption of fish in wastewater effluent dominated Colorado streams. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 144 : 10 -15.

## Apêndices

---

**Apêndice 1** - Média e desvio-padrão dos parâmetros físico-químicos registados por estação do ano e ponto de amostragem no estuário do rio Minho (OD, oxigénio dissolvido).

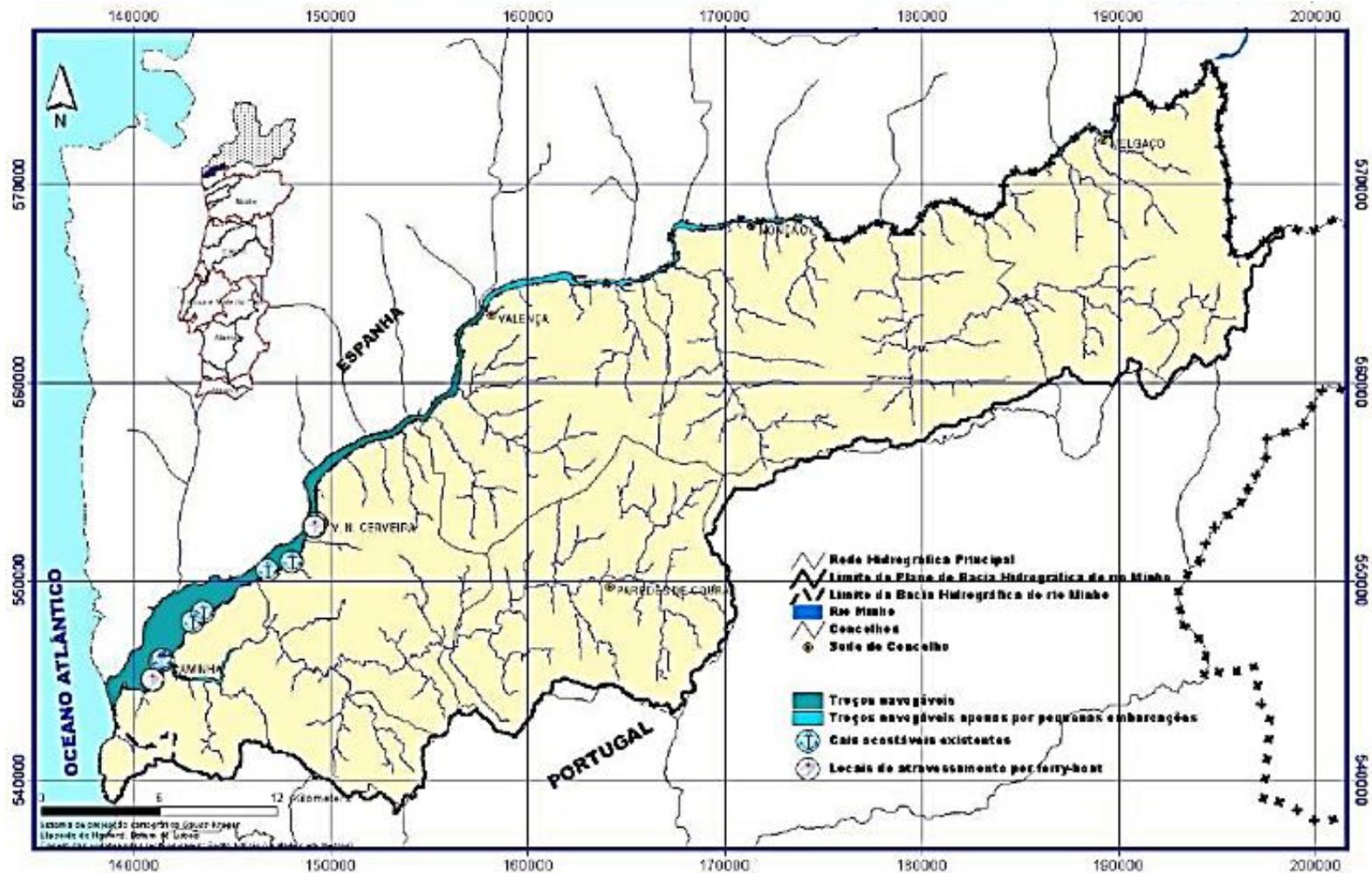
Sazonalidade	Ponto de amostragem	Parâmetros abióticos						
		Temperatura (°C)	Salinidade (psu)	Condutividade ( $\mu\text{Scm}^{-1}$ )	pH	Oxigénio dissolvido (%)	Oxigénio dissolvido (mg/L)	Clorofilas ( $\mu\text{gL}^{-1}$ )
Primavera	S1	14,49 ± 1,80	20,53 ± 8,83	32,83 ± 13,01	8,25 ± 0,30	102,56 ± 3,23	9,28 ± 0,58	4,36 ± 8,02
Verão	S1	17,23 ± 2,27	27,79 ± 10,39	42,42 ± 15,23	8,12 ± 0,35	107,17 ± 8,70	8,81 ± 0,54	4,92 ± 2,31
Outono	S1	15,25 ± 0,35	30,01 ± 4,12	46,20 ± 5,76	8,25 ± 0,21	94,75 ± 0,35	7,90 ± 0,28	1,40 ± 0,42
Inverno	S1	9,55 ± 1,42	0,78 ± 0,13	1,53 ± 0,21	8,20 ± 0,60	94,60 ± 1,61	10,75 ± 0,90	1,20 ± 1,40
Primavera	S2	14,61 ± 1,94	8,63 ± 8,61	12,96 ± 12,06	8,62 ± 0,25	102,64 ± 4,20	9,96 ± 0,34	1,69 ± 0,99
Verão	S2	21,20 ± 0,77	8,05 ± 3,06	12,20 ± 3,50	8,10 ± 0,47	96,75 ± 4,61	8,26 ± 0,45	3,47 ± 2,39
Outono	S2	15,40 ± 0,00	31,90 ± 0,95	48,90 ± 1,24	8,40 ± 0,00	95,00 ± 0,99	7,85 ± 0,21	2,10 ± 0,28
Inverno	S2	10,77 ± 0,95	0,35 ± 0,01	0,70 ± 0,01	8,60 ± 0,42	94,10 ± 3,35	10,33 ± 0,59	1,93 ± 0,79
Primavera	S3	13,95 ± 2,34	2,02 ± 2,21	3,77 ± 4,01	8,44 ± 0,22	98,78 ± 3,11	10,09 ± 0,65	1,36 ± 1,02
Verão	S3	21,93 ± 0,93	2,77 ± 2,27	5,04 ± 3,96	8,56 ± 0,32	99,60 ± 6,44	8,58 ± 0,59	7,10 ± 5,59
Outono	S3	14,00 ± 0,28	8,66 ± 3,32	14,39 ± 5,90	8,60 ± 0,14	91,70 ±	8,80 ±	1,40 ± 0,57
Inverno	S3	10,33 ± 0,07	0,05 ± 0,09	0,09 ± 0,19	8,90 ± 0,57	93,48 ± 0,57	10,45 ± 0,07	2,58 ± 0,00

**Apêndice 2** - Resultados da PERMANOVA para cada um dos parâmetros físico-químicos entre estações do ano (estação) e ponto de amostragem. Diferenças significativas em itálico.

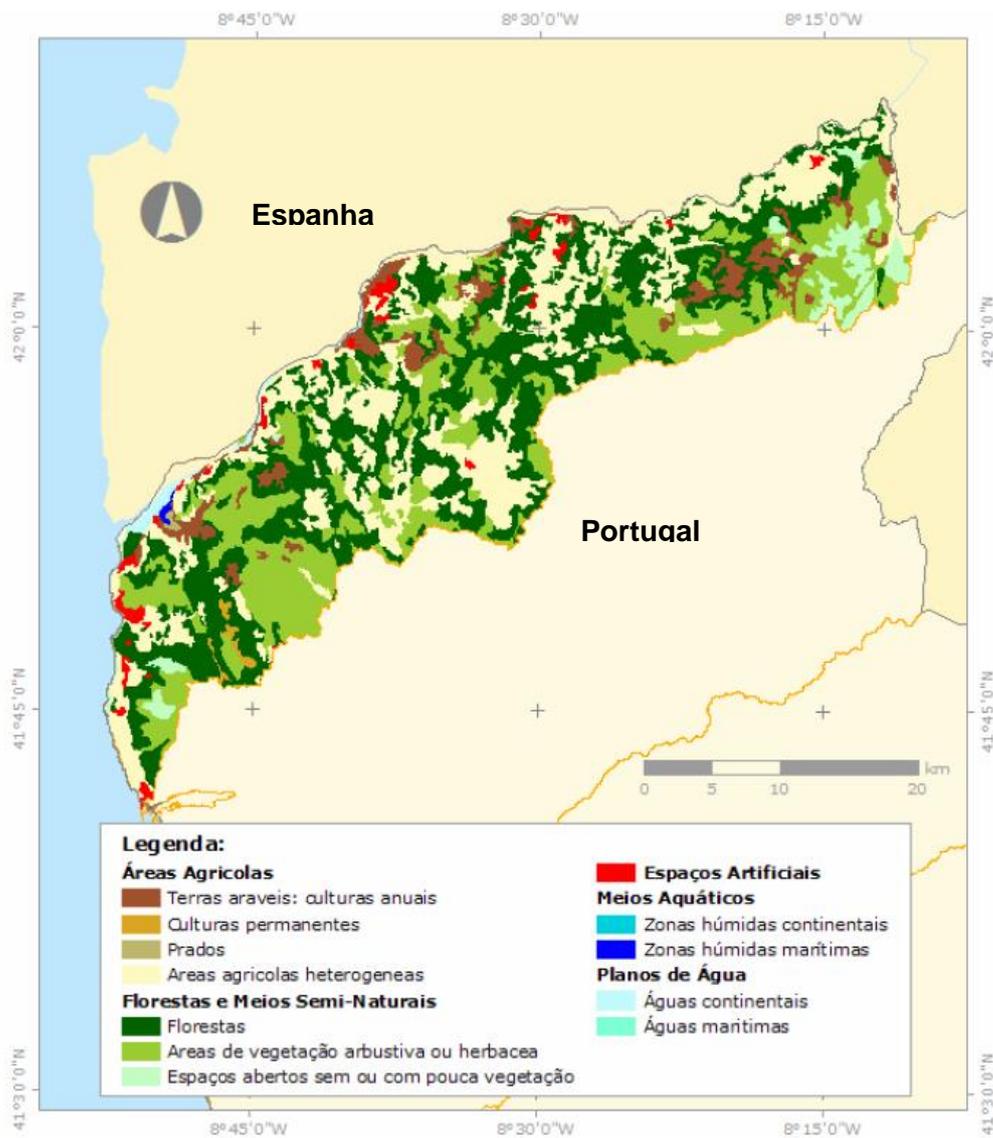
		<b>df</b>	<b>pseudo -F</b>	<b>p</b>
Temperatura (°C)	Estação	3	77,89	<i>&lt;0,0001</i>
	Ponto de amostragem	2	2,457	<i>&gt;0,05</i>
	Interação	6	3,638	<i>&lt;0,05</i>
Salinidade (psu)	Estação	3	17,6	<i>&lt;0,0001</i>
	Ponto de amostragem	2	46,29	<i>&lt;0,0001</i>
	Interação	6	4,277	<i>&lt;0,05</i>
Condutividade (mScm <sup>-1</sup> )	Estação	3	19,75	<i>&lt;0,0001</i>
	Ponto de amostragem	2	51,74	<i>&lt;0,0001</i>
	Interação	6	4,558	<i>&lt;0,05</i>
pH	Estação	3	2,526	<i>&gt;0,05</i>
	Ponto de amostragem	2	6,372	<i>&lt;0,05</i>
	Interação	6	1,421	<i>&gt;0,05</i>
Oxigénio dissolvido (%)	Estação	3	9,045	<i>&lt;0,0001</i>
	Ponto de amostragem	2	5,936	<i>&lt;0,05</i>
	Interação	6	1,753	<i>&gt;0,05</i>
Oxigénio dissolvido (mg/L)	Estação	3	40,12	<i>&lt;0,0001</i>
	Ponto de amostragem	2	3,481	<i>&lt;0,05</i>
	Interação	6	2,42	<i>&lt;0,05</i>
Clorofilas (µgL <sup>-1</sup> )	Estação	3	2,392	<i>&gt;0,05</i>
	Ponto de amostragem	2	0,7149	<i>&gt;0,05</i>
	Interação	6	0,6985	<i>&gt;0,05</i>

## Anexos

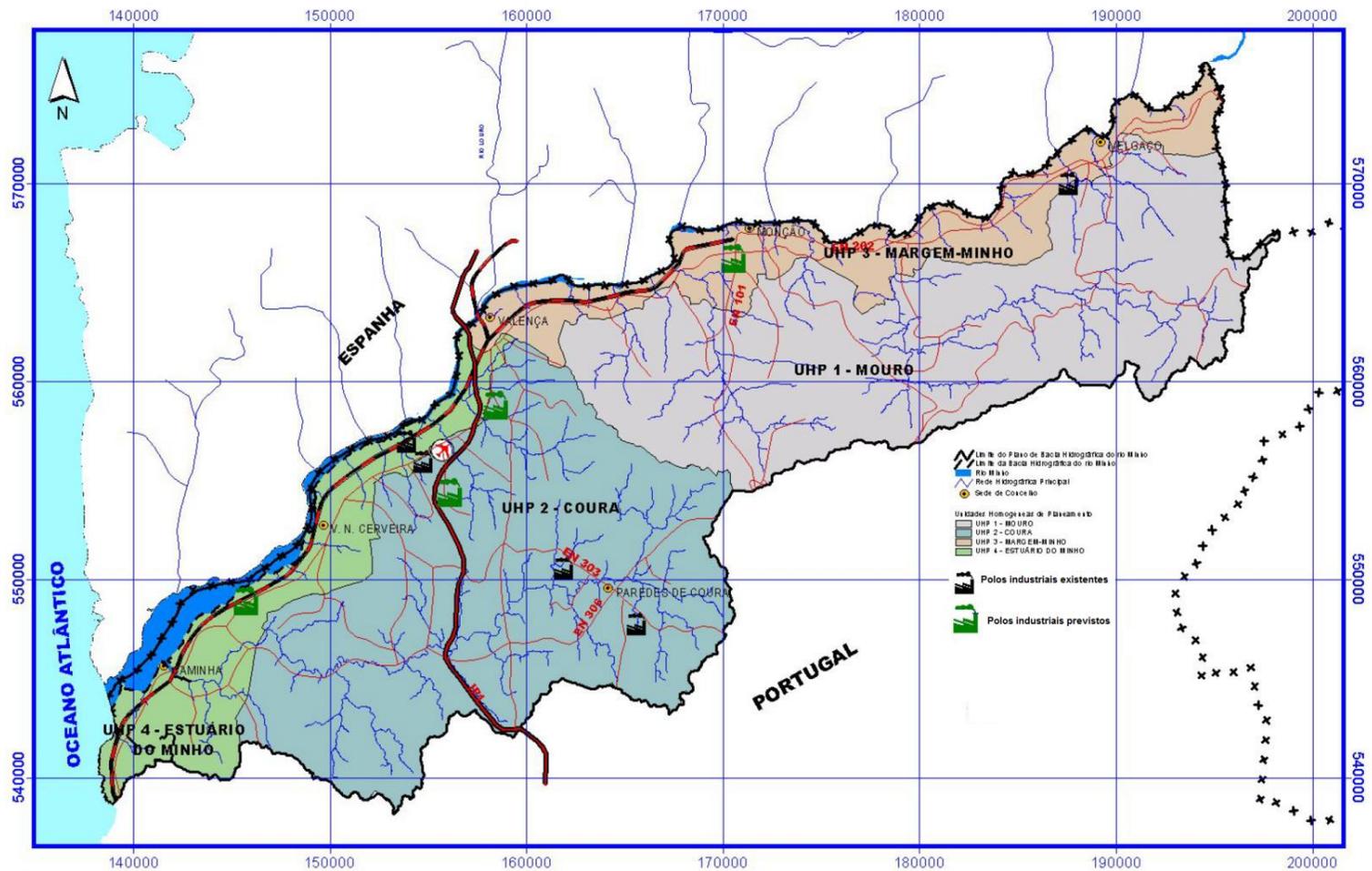
---



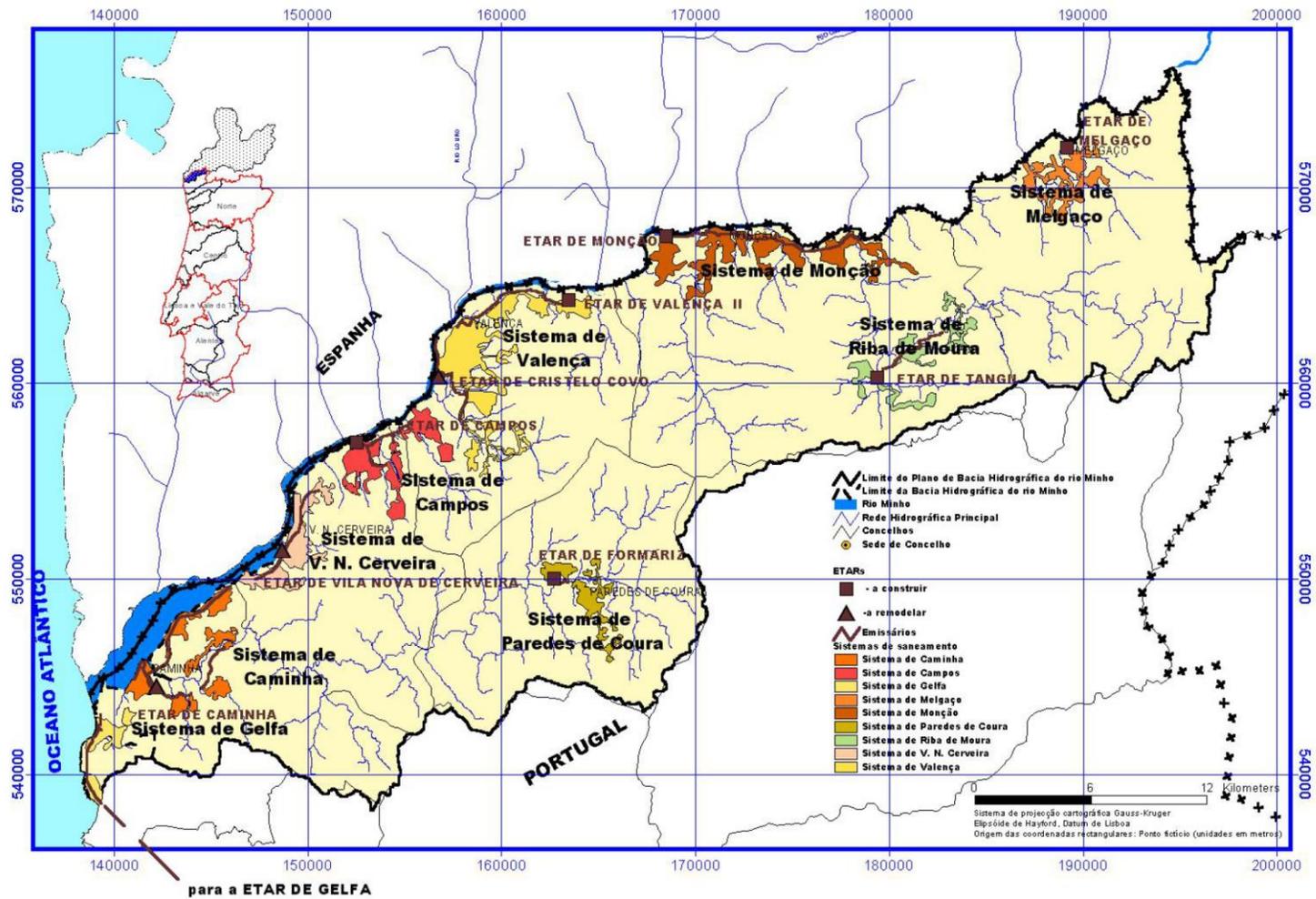
Anexo 1: Bacia Hidrográfica do rio Minho referente à parte portuguesa. Fonte: PHB, 2001



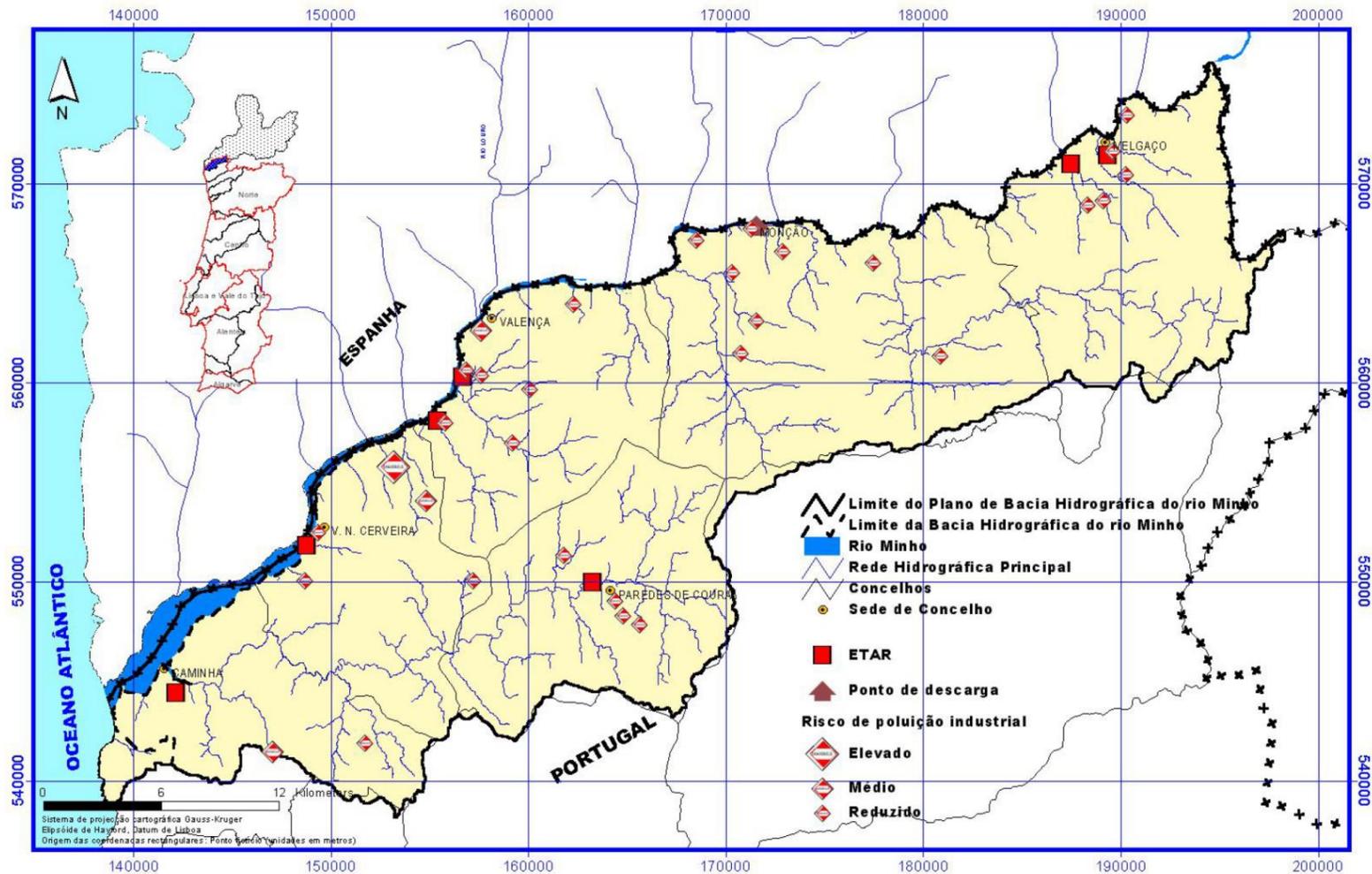
**Anexo 2** - Ocupação do solo na área abrangida pela Bacia Hidrográfica do rio Minho.  
 Fonte: SNIRH, 2014.



Anexo 3 - Zonas industriais existentes na área portuguesa abrangida pela Bacia Hidrográfica do rio Minho. Fonte: PHB, 2001.



Anexo 4 - Sistemas de saneamento propostos para a área portuguesa abrangida pela Bacia Hidrográfica do rio Minho. Fonte: PHB, 2001.



Anexo 5 - Representação das zonas com risco de poluição situadas na parte portuguesa da Bacia Hidrográfica do rio Minho. Fonte: PHB, 2001.