

Thales Viana Labourdette Costa

PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA ELISA PARA DETERMINAÇÃO DE
ETINILESTRADIOL EM AMOSTRAS AMBIENTAIS DE ÁGUA E ESGOTO

Brasília, DF

2018

PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA ELISA PARA DETERMINAÇÃO DE
ETINILESTRADIOL EM AMOSTRAS AMBIENTAIS DE ÁGUA E ESGOTO

Orientando: Thales Viana Labourdette Costa

Matrícula: 14/0163611

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Homem de Mello

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade de Brasília como requisito parcial
para obtenção do grau de Farmacêutico.

Brasília, DF 2018

Thales Viana Labourdette Costa

PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA ELISA PARA DETERMINAÇÃO DE
ETINILESTRADIOL EM AMOSTRAS AMBIENTAIS DE ÁGUA E ESGOTO

Projeto de pesquisa apresentado ao curso de Farmácia da Universidade de Brasília – UnB, como requisito final para aprovação em Trabalho de Conclusão de Curso e obtenção de grau bacharelado, sobre orientação do professor Maurício Homem de Mello.

Universidade de Brasília, ____ de _____ de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Maurício Homem de Mello

Prof(a). Pérola de Oliveira Magalhães

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos de dentro e fora da Universidade, que contribuíram em variados graus na concepção do presente trabalho e me proporcionaram experiências que acarretaram na minha evolução como aluno, amigo e ser humano.

Ao meu pai Luiz Carlos, à minha mãe Ieda e minha irmã Renata, por se aventurarem na jornada da vida ao meu lado, nos dias de adversidade e nos dias de fortuna, sempre zelando pelo meu bem-estar e me motivando a seguir em frente não importa o que acontecesse.

À Universidade de Brasília, que por mais robustos que sejam os óbices que me foram impostos e abundantes suas imperfeições, atuou como gatilho na gênese da minha atual visão de mundo, relações humanas e dos meus subjetivos sonhos e objetivos, além de ser a instituição que me permitiu usufruir de suas benesses e ultimação das pesquisas ali desenvolvidas.

À futura Ma. Juliana, que me auxiliou na execução do projeto e na elaboração da escrita, sem a qual esse projeto não teria sido concebido com a mesma exuberância e os dias *in laboratorium* não teriam tido o mesmo entusiasmo.

Aos professores da Instituição Universidade de Brasília e meus preceptores de estágio, que me ensinaram tudo o que sei hoje acerca do curso e da pós-academia. Em especial, a professora Pérola de Oliveira Magalhães, por ter me aberto incontáveis portas e imensuráveis oportunidades, e ao professor Maurício Homem de Mello por ter aceitado me orientar, dar a maior atenção possível no momento e por ter compartilhado o sonho de protagonizar uma inédita pesquisa *in silico* na Faculdade de Ciências da Saúde, que apesar de todas as dificuldades, não se deu por vencido e permanece como um exemplo.

A Deus, supremo arquiteto do universo, cedo ou tarde me elucidará da importância de cada momento inconveniente, e a todos os quais a infelicidade do limite de espaço não me permite contemplar, mas que jamais serão esquecidos.

RESUMO

O 17 α -etinilestradiol é um estradiol sintético derivado do 17 β -estradiol, sendo atualmente utilizado como agente medicamentoso anticoncepcional na forma de pílulas de administração oral e excretado naturalmente pelo corpo. Por sua natureza de hormônio estrogênio, é produzido à um nível basal em seres humanos variando com a idade e da fase do ciclo menstrual em mulheres. No entanto, por mimetizar a ação hormonal, é classificado como um desregulador endócrino, tendo o potencial de modificar de forma indesejada o metabolismo hormonal do organismo com o qual entra em contato, sobre baixas concentrações. Dentre as suas implicações quando acumulado na natureza, o etinilestradiol quando em biomas aquáticos pode acarretar um comprometimento da vida marinha da região, modificando os níveis hormonais e alterando os parâmetros de crescimento e reprodução dos seres vivos aquáticos. Apesar das implicações da presença do hormônio em águas que estão em contato direto e indireto com seres vivos, não existem atualmente legislações vigentes que estabelecem limites máximos da concentração da molécula em águas naturais e tratadas, e estudos toxicológicos não vêm dando destaque para seu acúmulo nessas águas, gerando uma falta de estudos direcionados para a caracterização da presença e quantificação do mesmo em águas. Recentemente, o fenômeno vem atraindo cada vez mais a atenção de pesquisadores, que além de quantificar a substância e realizar a análise dos dados, vêm também buscando uma metodologia com melhor custo-benefício, economicamente viável e que mantenha a especificidade e exatidão, sem a intercorrência de contaminantes. Tomando os conceitos anteriores como base, o presente trabalho visa a validação e padronização da metodologia de filtração, extração em fase sólida e ELISA, como metodologia quantitativa, para determinar a presença do hormônio em questão sobre diferentes amostras de água coletadas na região do Distrito Federal (DF) - Brasília, Brasil, correlacionando os resultados obtidos com cada tipo de água coletado e com a posologia desreguladora observada na bibliografia e investigar a qualidade do tratamento no qual a água da região é submetida.

Palavras-chave: 17 α -etinilestradiol, intoxicação, desregulador endócrino, filtração, extração em fase sólida, ELISA, padronização, metodologia.

ABSTRACT

17 α -ethinylestradiol is a synthetic estradiol derived from 17 β -estradiol, currently being used as a contraceptive drug agent in the form of oral administration pills and excreted naturally by the body. Because of its nature of estrogenic hormone, it is produced at a basal level in humans varying with age and stage of the menstrual cycle in women. However, because of its hormonal action mimic, it is classified as an endocrine disruptor, with the potential to undesirably modify the hormonal metabolism of the body which it get's in contact with, on low concentrations. Among its implications when accumulated in nature, ethinylestradiol when in aquatic biomes can lead to a compromise of marine life in the region, modifying hormonal levels and changing the parameters of growth and reproduction of aquatic beings. Despite the implications of the presence of the hormone in waters that are in direct and indirect contact with living beings, there are currently no valid legislation that establish maximum limits of the concentration of the molecule in natural and treated waters, and toxicological studies have not been highlighting its accumulation in these waters, generating a lack of studies aimed at the characterization of the presence and quantification of the same in waters. Recently, the phenomenon has attracted more and more attention from researchers, who in addition to quantify the substance and perform the data analysis, are also looking for a methodology that is more cost-effective, economically viable and that maintains specificity and accuracy without the interurrence of contaminants. Taking the previous concepts as a basis, the present work aims at the validation and standardization of the methodology of filtration, solid-phase extraction and ELISA, as quantitative methodology, to determine the presence of the hormone in question on different samples of water collected in the region of Distrito Federal (DF) - Brasília, Brazil, correlating the results obtained with each type of water collected and with the deregulatory dosage observed in the bibliography and investigating the quality of the treatment in which the water of the region is submitted.

Keywords: 17 α -ethinylestradiol, intoxication, endocrine disruptor, filtration, solid-phase extraction, ELISA, padronization, methodology.

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1. Reação de oxidação da 3,3',5,5' Tetrametilbenzidina	10
Figura 2. Filtração a vácuo	15
Figura 3. Fluxograma pré-tratamento das amostras	17
Figura 4. Fases da extração em fase sólida.....	17
Figura 5. Fluxograma ELISA.....	20
Figura 6. Curva padrão do teste piloto.....	22
Figura 7. Concentração média do teste piloto.....	23
Figura 8. Curva padrão do teste das amostras	25
Figura 9. Concentração média das amostras da primeira coleta.....	25
Figura 10. Concentração média das amostras da segunda coleta.....	26
Figura 11. Comparação de concentração das duas coletas.....	27
Tabela 1. Caracterização das Amostras	13
Tabela 2. Distribuição dos pilotos na placa.....	19
Tabela 3. Distribuição das amostras na placa.....	20
Tabela 4. Dados dos pilotos.....	22
Tabela 5. Dados das amostras	26
Tabela 6. Reatividade Cruzada do Anticorpo	30

LISTA DE ABREVIATURAS

B/B₀- Razão entre a absorbância da amostra e a absorbância no ponto 0

DAD- Detector por Arranjo de Diodos

EE2- 17 α -Ethinilestradiol

ELISA- Enzyme-Linked Immunosorent Assay

ESI- Ionização por Eletronspray

ETE- Estação de Tratamento de Esgoto

GC- Cromatografia Gasosa

HPLC- High Performance Liquid Chromatography

LC- Cromatografia Líquida

MeOH- Metanol

MS- Espectrometria de Massa

PNDS- Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Mulher

QuEchERS- Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	12
3. METODOLOGIA.....	12
3.1 Coleta e armazenamento da amostra	12
3.2.1. Preparação para o teste piloto	14
3.2.2. Preparação para o ensaio das amostras.....	14
3.3.1. Concentração para o teste piloto	15
3.3.2. Concentração para o ensaio das amostras.....	16
3.4.1. ELISA e leitura do teste piloto.....	18
3.4.2. ELISA e leitura para o ensaio das amostras	19
3.5. Análise de dados.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5. CONCLUSÃO.....	32
6. REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

Métodos anticoncepcionais são definidos como maneiras, medicamentos, objetos e cirurgias, que podem abranger ora o sexo masculino, ora o feminino, e que possuem a finalidade de prevenir a gravidez. Podem ser irreversíveis quando seu uso implica, em mulheres, a incapacidade de engravidar para o resto da vida, ou reversíveis, quando existe a possibilidade de gravidez após o término do uso (BRASIL., 2006). Permitem a realização de relações sexuais com controle de natalidade e planejamento familiar, sem correr o risco de gerar uma gravidez indesejada. Devem proporcionar o máximo de conforto e privacidade, ao mesmo tempo que deve ter o mínimo de custo e efeitos adversos (RAKHI; SUMATHI., 2011). No Brasil, durante os últimos 30 anos o uso de métodos contraceptivos em mulheres com idade fértil que moravam com seus parceiros aumentou de 66,2% em 1986 para 80,6% em 2006 (OLSEN et al., 2018). Na última Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher (PNDS) realizada pelo Ministério da Saúde, em 2006, observou-se uma tendência do uso de preservativos e uma maior participação masculina na contracepção, que antes era majoritariamente feminina, indicando um aumento da busca e do uso de métodos contraceptivos que tende a aumentar com os anos subsequentes (BRASIL., 2006). Estima-se que em 2017, 63% das mulheres em idade fértil (entre 15 e 49 anos) faziam uso de algum método contraceptivo, enquanto que 58% das mulheres

casadas ou em estado de união e em idade reprodutiva faziam uso de algum método moderno de contracepção, totalizando 92% do total de mulheres em idade fértil que faziam uso de algum método contraceptivo (UNITED NATIONS., 2017). Métodos modernos de contracepção, por sua vez, podem ser definidos como produtos ou procedimentos médicos que interferem na reprodução durante atos sexuais (HUBACHER; TRUSSELL., 2015)

Dentre os diversos métodos contraceptivos disponíveis no mercado, os anticoncepcionais de uso oral, também denominados de pílulas anticoncepcionais, se destacam por seu amplo uso. São esteroides que podem ser utilizados sozinhos ou em conjunto com outro esteroide, e quando utilizados de forma isolada são denominados de minipílula ou anticoncepcional que contém apenas progesterina, composto análogo ao progestogênio e que contém as mesmas funcionalidades fisiológicas, e sua formulação contém apenas a progesterina como princípio ativo sem implicar uma eficiência menor em relação às outras formas farmacêuticas (YONKERS., 2005). Quando dois esteroides são utilizados em conjunto a pílula é chamada de pílula combinada, que contém em sua composição farmacológica um estrogênio e um progestógeno. As pílulas combinadas, por sua vez, são classificadas em monofásicas, possuindo uma dose igual e constante dos dois esteroides em todos os comprimidos; bifásicas, contendo em seus comprimidos duas proporções diferentes dos hormônios, para serem administradas em diferentes momentos do ciclo mensal; e trifásicas, que contém três

proporções hormonais diferentes, para serem administrados em três fases distintas do ciclo (BRASIL., 2002).

Um dos fármacos utilizados como contraceptivo oral no Brasil é o 17 α -etinilestradiol (EE2) (FARIAS et al., 2016). É um estrogênio sintético (LINTELMANN et al., 2003) e possui similaridade estrutural ao estrogênio natural, característica farmacológica que permite a molécula exercer o mecanismo de ação intrínseco do grupo: se liga aos receptores citosólicos de estrogênio E α e E β , rompendo suas ligações com suas proteínas estabilizadoras e dimerizando-os com outros receptores, aumentando assim sua afinidade e taxa de ligação ao DNA. Os dímeros resultantes do estímulo hormonal, por sua vez, se ligam a sequências específicas de nucleotídeos denominadas de elementos de resposta dos estrogênios (ELE), localizadas na região reguladora de vários genes, com sua sequência homóloga GGTCANNNTGACC ativando assim a transcrição gênica de genes-alvo (HARDMAN; GILMAN., 2003). Após a transcrição, o complexo receptor-estrogênio se dissocia e o receptor migra novamente para o citoplasma, podendo interagir novamente com outro estrogênio (SILVA., 2010). Após sua administração, estima-se que 43% da droga seja metabolizada e que 57% seja excretada nas urinas e fezes, sendo 30% da excreção em sua forma original e 27% conjugada. Cerca de 70% das moléculas conjugadas de EE2 excretado estão ligadas a glicuronídeos e consequentemente inativadas, que podem, todavia, ser biotransformadas novamente na molécula original não-conjugada

por bactérias no esgoto, possibilitando a recuperação de atividade da molécula (SANTOS., 2011).

Possui alta atividade endócrina mesmo quando ingerido em via oral, permitindo sua administração em doses na escala de microgramas. A primeira patente contendo uma preparação de etinilestradiol foi realizada em Berlim no ano de 1935 pelos pesquisadores A. SERINI e L. STRASSBERGER, com o intuito de que a molécula sintetizada servisse como precursora para outras substâncias de valor fisiológico. No entanto, a literatura científica atribui à patente dos pesquisadores W. HOHLWEG e H. H. INHOFFEN, realizada em Berlim no ano de 1937, a popularização mundial da molécula por descrever de forma mais detalhada o processo de obtenção de etinilestradiol com 90% de rendimento (FROBENIUS., 2011). Foi concebido em pílulas anticoncepcionais como um substituto ao Mestranol, seu pró-fármaco, que havia sido amplamente utilizado na primeira geração de anticoncepcionais orais sobre o nome de Enovid (JUNOD; MARKS., 2002), a fim de minimizar o sangramento de escape e reforçar o feedback negativo de progestogênios sobre o eixo hipotálamo-hipófise, e desde então seu uso vêm sendo aprovado em associação com progestinas em anticoncepcionais orais (ALSINA., 2010).

No entanto, o EE2 faz parte de um grupo de moléculas denominadas de desreguladores endócrinos (DE) ou disruptores endócrinos (SNYDER et al., 2003), sendo definidos como substâncias químicas de origem exógena ou xenobiótica que

possuem a capacidade de mimetizar ou inibir ações do sistema endócrino, por meio de interação com receptores, moléculas e proteínas transportadoras ao mesmo tempo em que possuem resistência a degradação física, química e bioquímica (SUMPTER., 2005), (LAUDERSON et al., 2014), permitindo seu acúmulo na natureza e conseqüentemente exposição á seres vivos (CALIMAN; GAVRILESCU., 2009) (MORAES et al., 2008), (NADAL et al., 2017). Atualmente incluem um grupo diverso de moléculas, dentre elas estrogênios, andrógenos, progestinas, compostos industriais com atividade hormonal, alquilfenóis, bisfenol A, inseticidas e ftalatos (METZLER; PFEIFFER., 2001). O EE2 se encontra dentro de tal classificação por mimetizar a ação de estrogênios naturais e potencialmente alterar a função endócrina de organismos dos quais pode, involuntariamente, entrar em contato (LINTELMANN et al., 2003). Sua presença foi descrita em águas residuais em diversas localizações distintas ao redor do mundo (BARONTI et al., 2000) (LIU et al., 2004) (ZHOU et al., 2007) (RACZ; GOEL., 2010) (SILVA et al., 2012), todavia a molécula não possuía a devida atenção dos pesquisadores até as últimas duas décadas, quando se começou a especular que sua presença na água decorreria da ineficiência do tratamento convencional de água do esgoto na remoção das substâncias (LEECH et al., 2008).

Relatos acerca da toxicologia do EE2 envolvem sobretudo um comprometimento da biologia marinha devido a seu acúmulo propício nesse meio. Algumas das alterações endócrinas envolvem

aumento da produção de vitelogenina e alterações na proporção de gênero de nascimento em peixes *Danio rerio* (ÖRN et al., 2003), diminuição na produção de ovos, peso das gônadas e expressão de aromatase em peixes *Oryzias latipes* (SCHOLZ; GUTZEIT., 2000), mudanças no tamanho de órgãos, na atividade da enzima etoxiresorufina-o-deetilase, acúmulo de fluido na cavidade abdominal, palidez no fígado, alterações nas mudanças de cor em período de acasalamento, aumento de expressão de vitelogenina e diminuição da expressão da proteína *spiggin* em relação à peixes-controle (ANDERSSON et al., 2007), decaimento da taxa de fertilização e desenvolvimento embrionário em mexilhões *Perna perna* (NUNES., 2015), desenvolvimento de tecido ovariano no testículo esquerdo de aves *Coturnix japonica* (BERG et al., 1999) e aumento da atividade fitoestrogênica em folhas de *Medicago sativa* irrigadas com água de esgoto (SHORE et al., 1999). Apesar dos relatos de indução de efeitos colaterais no contexto da vida marinha, não existem atualmente limites máximos de EE2 que as águas possam conter, tanto no Brasil quanto na Europa e Estados Unidos, devendo-se ao fato de que os efeitos indesejados da molécula foram amplamente negligenciados no passado e apenas recentemente está surgindo uma bibliografia fidedigna a sua toxicologia, a fim de incluí-la na categoria de substâncias submetidas a controle. Além disso, países europeus desistiram por hora de incluir limites máximos para a substância pois os mesmos arcariam com um custo demasiadamente elevado para implementar um tratamento mais

adequado para remover o hormônio da água (CUNHA et al., 2016).

Devido a seus efeitos prejudiciais, vários estudos toxicológicos buscam avaliar e quantificar a presença de EE2 em ambientes aquáticos; (GUISELLI., 2006), (GEROLIN., 2008), (TORRES., 2009), (ZHANG et al., 2009), enquanto outros propõem métodos inovadores altamente sensíveis de remoção de EE2 de matrizes aquáticas junto com outros desreguladores endócrinos (BERTANZA et al., 2010), (MAURÍCIO et al., 2018). Atualmente, as metodologias envolvidas nas análises de caracterização e quantificação do hormônio em amostras ambientais envolvem a extração em fase sólida seguida de LC-MS/MS (BARONTI et al., 2000); (BLUE et al., 2018); (GUISELLI., 2006), LC-DAD (ALDA; BARCELÓ., 2000), GC-MS (KUCH; BALLSCHMITER., 2001); (TERNES et al., 1999), HPLC-MS/MS (FARRÉ et al., 2007), (GEROLIN., 2008); CL/MS-ESI e CLEE (KOLPIN et al., 2002). A espectrometria de massas não é utilizada de forma isolada pois pode acarretar em uma detecção errônea de altos níveis de etinilestradiol devido a uma sobreposição de impurezas contaminantes com o pico da molécula (JOHNSON et al., 2000), (HANNAH et al., 2009), (ZHANG et al., 2009), (SANTOS., 2011).

Apesar de sua alta especificidade, as metodologias envolvidas na caracterização e quantificação da molécula estão submetidas aos vieses de custo elevado de aquisição e manutenção dos instrumentos além de conhecimento técnico para a utilização dos mesmos, criando um contexto propício para uma busca de novas

metodologias com melhor custo-benefício (HINTEMANN., 2006).

Neste contexto, a metodologia ELISA se destaca como método qualitativo e quantitativo de alta especificidade e sensibilidade com custo viável, que possui a capacidade de analisar rapidamente várias amostras de forma simultânea, ao mesmo tempo que dispensa grandes volumes da amostra a ser analisada (CARON et al., 2010). Sua descoberta é atribuída aos pesquisadores E. ENGVALL e P. PERLMANN, que em 1970 propuseram uma metodologia inédita de detecção de antígenos por meio de anticorpos conjugados com enzimas, seguido de um ensaio de atividade enzimática (ENGVALL; PERLMANN., 1971). Atualmente, tem-se a definição de ELISA como metodologia de mensuração de algum sinal liberado por um substrato, previamente catalisado por uma reação enzimática de uma enzima conjugada a um anticorpo (EMON., 2001). Por outro lado, para a detecção de analitos na concentração de ng/L, a metodologia deve ser antecedida por uma extração em fase sólida (LAFLEUR; SCHUG., 2011). A extração em fase sólida, por sua vez é um método de concentração de analito, no qual a matriz aquosa passa por um cartucho contendo sorvente, retendo o analito e interferentes. Os interferentes são então removidos por lavagem e o analito de interesse é eluído do cartucho, permitindo sua quantificação (BARRIONUEVO; LANÇAS., 2001).

A metodologia ELISA também possui a capacidade de detectar e quantificar a presença do 17 α -etinilestradiol em matrizes aquáticas de interesse. Para isso, o anticorpo monoclonal anti-

etinilestradiol permanece aderido no fundo dos poços da placa com suas cadeias leves expostas, fornecendo um sítio de ligação para o EE2 presente nas amostras, do qual possui grande afinidade. Na sua ausência, liga-se com o antígeno conjugado a uma enzima do grupo das peroxidases. A preferência do anticorpo pela ligação com o etinilestradiol e a presença da peroxidase conjugada ao antígeno do anticorpo permitem a posterior quantificação da ligação do anticorpo ao hormônio pela reação colorimétrica de catálise de um substrato enzimático para a enzima em questão, juntamente com comparação do resultado de absorvância obtido das amostras a uma curva padrão de concentrações conhecidas contendo o substrato enzimático para a peroxidase, uma molécula chamada de 3,3',5,5' Tetrametilbenzidina, uma amina aromática que atua como co-substrato sendo oxidada duas vezes seguidas durante a reação de degradação enzimática de peróxidos de hidrogênio, liberando um produto com coloração azul chamado de 3,3',5,5' Tetrametilbenzidina diimina, que absorve sobre o comprimento de onda de 450 nm possibilitando a leitura da placa sobre o determinado comprimento de onda (Figura 1). Após a adição da solução de coloração, a placa foi incubada durante 30 minutos e foi adicionada uma “solução de paragem” contendo ácido sulfúrico, formando uma coloração amarela nos poços, indicando o êxito do processo e o encerramento da reação enzimática (JOSEPHY et al., 1982) (TOKIWA., 2007).

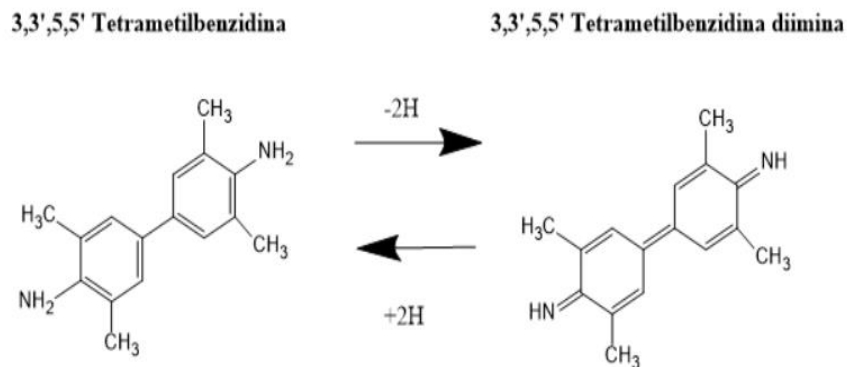


Figura 1: Reação de oxidação completa da 3,3',5,5' Tetrametilbenzidina gerando seu derivado de coloração azul.

Devido a seus benefícios, alguns estudos vêm fazendo uso da metodologia ELISA para a detecção de estrogênios em diferentes matrizes de água (FARRÉ et al., 2007), (MANICKUM; JOHN., 2015); (SWART; POOL., 2007); (VIGANÒ et al., 2008); (URAIPONG et al., 2017), porém a metodologia ELISA ainda se encontra submetida a interferências que podem diminuir a precisão e exatidão do resultado final do experimento. Tais interferências podem surgir sobre dois contextos distintos: interferências por parte da matriz de água ambiental a ser analisada, onde observa-se que diferentes ensaios de ELISA resultam em quantificações diferentes do analito devido à presença de substâncias húmicas co-extraídas junto do analito (HANSELMAN et al., 2004), e interferências por parte da extração do analito, uma vez que a utilização de extração em fase sólida para quantificação na escala de ng/L utiliza-se de solventes que podem interferir na metodologia (LAFLEUR; SCHUG., 2011).

Apesar das interferências, as modificações realizadas na metodologia visam principalmente um aumento ainda maior de sua sensibilidade, implicando um aumento do custo e tempo de preparo da metodologia, seja por imunização *in vivo* para produção de anticorpos policlonais (CARON et al., 2010), modificações na enzima peroxidase e incubação *overnight* para saturação sequencial (HINTEMANN., 2006), uso de microextração líquido-líquido para preparo das amostras para análise (LIMA et al., 2014), e aplicação de imunossensores microfluídicos (MARTINEZ et al., 2010).

No presente trabalho, propomos a padronização do ELISA imunoenensaio, para a detecção de EE2 em diferentes amostras de água e esgoto de diferentes sítios da região do Distrito Federal.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

-Desenvolvimento da metodologia ELISA como método para determinar a ocorrência e concentração de 17 α -etinilestradiol em diferentes amostras de água, esgoto e efluente de Brasília - DF

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Análise da necessidade de concentração da amostra em teste piloto;

- Verificação dos procedimentos de filtração em relação à remoção de material particulado;

- Avaliação do kit Ecologiena® para quantificação de EE2 em relação à sua facilidade de uso, capacidade de mensuração e reprodutibilidade.

3. METODOLOGIA

3.1 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

Definiu-se quatro tipos diferentes de amostras a serem analisadas: água proveniente do lago, esgoto, efluente, e água tratada destinada para consumo (Tabela 1). Foram realizadas coletas

de 1000 mL de cada amostra, em dois dias diferentes: a primeira no dia 03/04/2018 e a segunda no dia 14/06/2018 (estação chuvosa e estação seca de Brasília, respectivamente). Nesta última data foram coletados volumes adicionais das amostras da ETE norte (esgoto e efluente), calçadão da asa norte e água tratada, para testes piloto que serviriam de base para padronizar a concentração e a forma de filtração das amostras. Após a coleta os frascos foram armazenados em câmara fria sobre temperatura entre 2° e 8° C. Para cada frasco, adicionou-se MeOH de tal forma a se obter um volume final de 1% (v/v) a fim de conservar as amostras e prevenir eventuais crescimentos de micro-organismos.

Tabela 1: Caracterização das amostras coletadas

Nome da amostra	Tipo de amostra	Local de coleta
Ponte das Garças (PG)	Água do lago	Lago Paranoá
Calçadão da Asa Norte (CAN)	Água do lago	Lago Paranoá
Minas Tênis Clube (MTC)	Água do lago	Lago Paranoá
Ponto de captação (PC)	Água do lago	Lago Paranoá
Barragem (BA)	Água do lago	Lago Paranoá
Braço do Riacho Fundo (BRF)	Água do lago	Lago Paranoá
ETE Norte (ESEN)	Esgoto	Lago Paranoá
Efluente ETE Norte (EFEN)	Efluente	Lago Paranoá
ETE Sul (ESES)	Esgoto	Lago Paranoá
Efluente ETE Sul (EFES)	Efluente	Lago Paranoá

Tabela 1 (cont.)

ETE Riacho Fundo (ESRF)	Esgoto	Lago Paranoá
Efluente ETE Riacho Fundo (EFERF)	Efluente	Lago Paranoá
Água Tratada (AT)	Água tratada	Residência em Asa Norte

3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

3.2.1 Preparação para o teste piloto

Para a remoção de material particulado em suspensão, as 4 amostras-piloto foram filtradas uma única vez em membranas de fibra de vidro com 1 μ M de porosidade em conjunto de uma bomba a vácuo acoplada à kitasatos de volume igual a 1000 mL (Figura 2). Após a filtração, utilizou-se MeOH (1% v/v, em relação ao volume total de amostra filtrada) para eluir possíveis retenções nas partículas sólidas remanescentes nas membranas. Em seguida 1,5 mL de cada amostra-piloto filtrada foi alíquotada para o ensaio de ELISA sem passar pela parte de concentração.

3.2.2 Preparação para o ensaio das amostras

O procedimento para as amostras foi realizado padronizando-se o volume de 500 mL por amostra para a filtração, utilizando-se o mesmo sistema descrito previamente (Figura 2).

Foram realizadas, para cada amostra, duas filtrações seguidas em membranas de fibra de vidro de 1 μM de porosidade, e após sua conclusão, foi realizada mais uma filtração por amostra em membranas de nylon com 0,45 μM de porosidade para otimizar a remoção de contaminantes. Por fim, adicionou-se MeOH 1% v/v no filtrado das amostras. Todas as amostra-teste tiveram seu pH aferido e foram concentradas logo após a filtração.

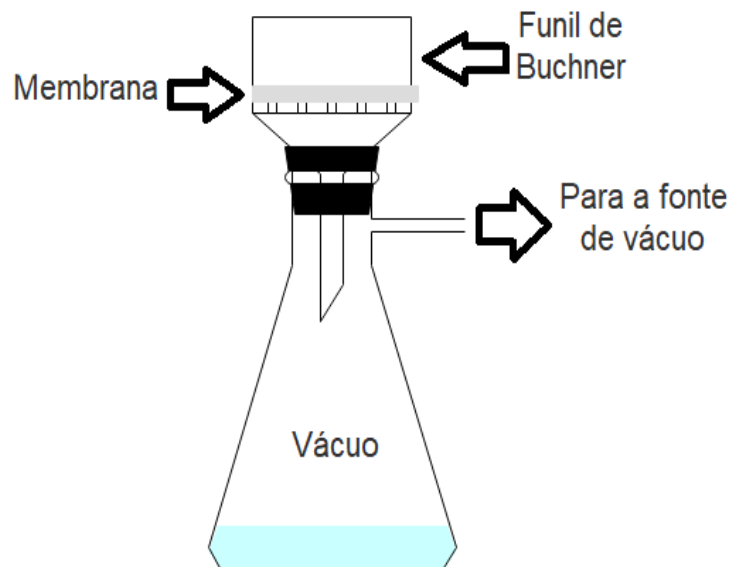


Figura 2: Filtração a vácuo, onde o kitasatos permanece conectado a uma bomba a vácuo.

3.3 CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS

3.3.1 Concentração para o teste piloto

Com exceção das alíquotas das amostras-piloto que não

seriam concentradas, as amostras-piloto foram submetidas à concentração via extração em fase sólida em manifold Visiprep (Supelco S.A., Bellefont, Pensilvânia, Estados Unidos) e bomba a vácuo, utilizando-se cartuchos contendo 500 mg de C18, (Supelco S.A.) como sorvente. Primeiramente, realizou-se o condicionamento dos cartuchos com 5 mL de MeOH e 10 mL de H₂O destilada, e após o condicionamento as amostras filtradas foram submetidas a passagem pelo cartucho na fase de carregamento, concentrando assim o analito de interesse, retido com os contaminantes de características apolares. Para a remoção destes últimos, 5 mL de H₂O destilada e foram submetidas a passagem pela coluna de C18, como parte do processo de lavagem do sorvente e remoção dos contaminantes, seguindo-se com 1 minuto de secagem do cartucho e posterior lavagem com 5 mL de hexano e remoção de contaminantes muito lipofílicos. Após as lavagens, os cartuchos foram eluidos com 5 mL de diclorometano, coletado em tubo de ensaio e evaporado sob fluxo de nitrogênio e temperatura entre 40 e 45°C. Após a secagem, o resíduo foi ressuspensionado em 500 µL de metanol e 450 µL de água destilada.

3.3.2 Concentração para o ensaio das amostras

A concentração das amostras foi realizada em conformidade com o sistema descrito anteriormente para os pilotos, passando pelas mesmas etapas de extração de fase sólida (condicionamento,

carreamento, lavagem e eluição) com mesmos eluentes e volumes. Diferentemente do teste piloto, as amostras foram submetidas a concentração logo após a etapa de filtração para se evitar crescimento indesejado de micro-organismos (Figura 3); (Figura 4).

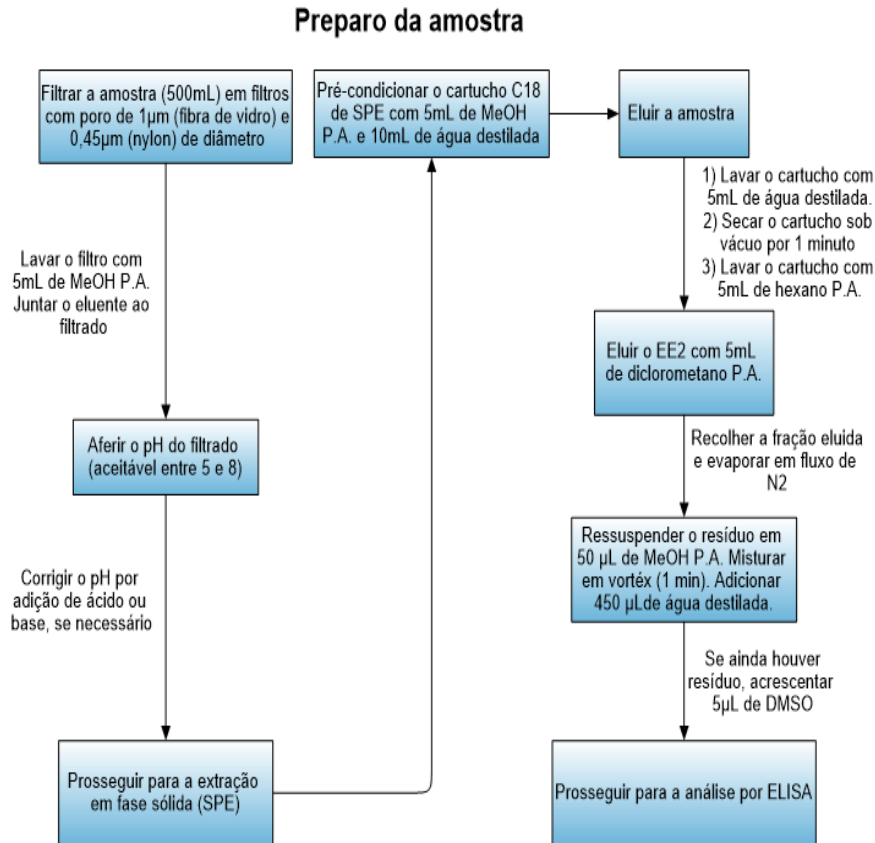


Figura 3: Fluxograma descrevendo o pré-tratamento e pré-lavagem das amostras submetidas ao ensaio de ELISA.

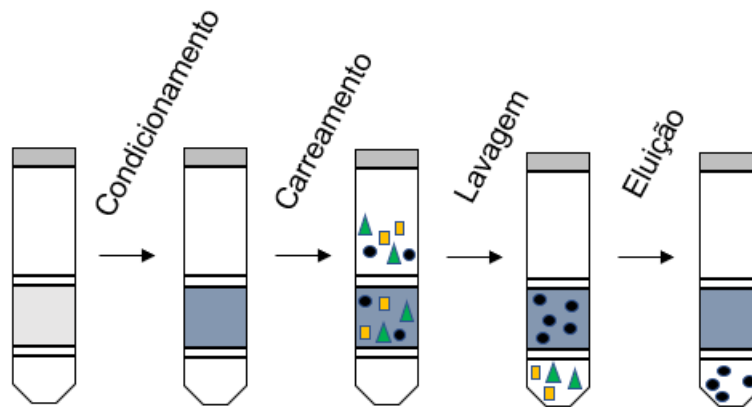


Figura 4: Extração em fase sólida com suas 4 fases distintas.

3.4 ELISA E LEITURA DAS AMOSTRAS

3.4.1 ELISA e leitura para o teste-piloto

O ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) foi realizado fazendo-se uma duplicata para cada amostra, incluindo os controles, de concentrações iguais a 0; 0,05; 0,15; 0,5 e 3 µg/L (Tabela 2). Sobre cada poço de uma placa de 96 poços convencional, foram pipetados 100 µL da solução contendo tampão com o antígeno conjugado com ao substrato enzimático, juntamente com 100 µL das amostras. Após a mistura, foram transferidos 100 µL da solução de cada poço para a placa de 96 poços contendo o anticorpo aderido, e a placa foi incubada durante 60 minutos sobre temperatura ambiente para a reação de ligação competitiva. Após finalizado o período de repouso da placa, o líquido que permaneceu nos poços foi removido e cada poço foi lavado 3 vezes seguidas com 300 µL de tampão de lavagem de concentração 1:6, para se remover o conjugado antígeno-enzima que não se ligou aos anticorpos. Os poços foram então tratados com 100 µL de solução de coloração e a placa foi incubada durante mais 30 minutos. Em seguida foram pipetados 100 µL de “solução de paragem” contendo ácido sulfúrico para encerrar a reação enzimática. Para as amostras-piloto foi realizada somente uma leitura de absorbância foram realizadas em leitor de microplacas da PerkinElmer (PerkinElmer, São Paulo, SP, Brasil) no comprimento de onda de 450 nm dentro de no máximo 15

minutos após a última pipetagem (JOSEPHY et al., 1982) (TOKIWA., 2007).

Tabela 2: Distribuição dos pilotos na placa de 96 poços

Padrão(0)	Padrão(0)	CAN(c*)	CAN(c*)
Padrão(0,05)	Padrão(0,05)	AT (nc**)	AT (nc**)
Padrão(0,15)	Padrão(0,15)	EFEN(nc**)	EFEN(nc**)
Padrão(0,5)	Padrão(0,5)	ESEN(nc**)	ESEN(nc**)
Padrão(3)	Padrão(3)	CAN(nc**)	CAN(nc**)
AT (c*)	AT (c*)		
EFEN(c*)	EFEN(c*)		
ESEN(c*)	ESEN(c*)		

*Concentrada

**Não concentrada

3.4.2 ELISA e leitura para o ensaio das amostras

Dois poços da placa foram reservados para a realização do branco (MeOH 10%), dois poços para cada padrão, e as amostras foram feitas em duplicata (Tabela 3). O manejo do experimento foi realizado em conformidade com o preconizado pelo kit (Figura 5). Foram feitas duas leituras da placa sobre o comprimento de onda de 450 nm e a curva foi construída com a média dos valores da leitura dos padrões.

ELISA

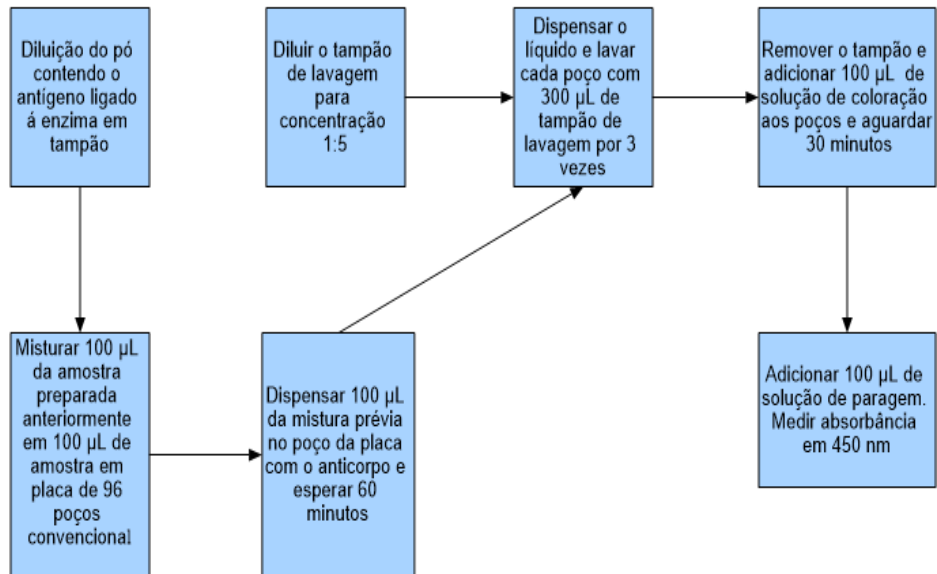


Figura 5: Fluxograma para a execução do teste de ELISA.

Tabela 3: Distribuição das amostras na placa de 96 poços

Br.*	Br.*	MTC 03/04	MTC 03/04	ESRF 03/04	ESRF 03/04	BRF 14/06	BRF 14/06
P**(0)	P**(0)	PC 03/04	PC 03/04	EFRF 03/04	EFRF 03/04	ESEN 14/06	ESEN 14/06
P**(0,05)	P**(0,05)	BA 03/04	BA 03/04	AT 03/04	AT 03/04	EFEN 14/06	EFEN 14/06
P**(0,15)	P**(0,15)	BRF 03/04	BRF 03/04	PG 14/06	PG 14/06	ESES 14/06	ESES 14/06
P**(0,5)	P**(0,5)	ESEN 03/04	ESEN 03/04	CAN 14/04	CAN 14/06	EFES 14/06	EFES 14/06
P**(3)	P**(3)	EFEN 03/04	EFEN 03/04	MTC 14/06	MTC 14/06	ESRF 14/06	ESRF 14/06
PG 03/04	PG 03/04	ESES 03/04	ESES 03/04	PC 14/06	PC 14/06	EFRF 14/06	EFRF 14/06
CAN 03/04	CAN 03/04	EFES 03/04	EFES 03/04	BA 14/06	BA 14/06	AT 14/06	AT 14/06

* Branco

** Padrão

3.5 Análise de dados

Após a leitura da microplaca, os valores de absorvância dos padrões de concentrações já conhecidas de EE2 foram utilizados para se construir uma curva de regressão logarítmica, onde B/B_0 (valor resultante da divisão da leitura de absorvância da amostra em relação a leitura de absorvância do padrão) foi utilizado como eixo Y e a concentração em $\mu\text{g/L}$ foi utilizada como eixo X. Os valores encontrados de absorvância para as amostras foram convertidos para os valores de concentração de EE2 em ng/L após os cálculos com base na curva e no fator de concentração das amostras.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste Piloto

O primeiro teste foi realizado somente com as amostras-piloto pré-selecionadas, filtrando cada amostra uma única vez em membranas de nylon com $0,45 \mu\text{M}$ de porosidade, a fim de avaliar a velocidade de filtração e extração das mesmas. Observou-se que as amostras filtravam de forma demasiadamente lenta e o processo foi então modificado para uma filtração em membrana de $1 \mu\text{M}$ de porosidade por amostra. Sobre esta última, as membranas filtravam mais rapidamente, otimizando a gestão de tempo do processo, e a estratégia foi então adotada. Todavia apesar de filtrarem mais

rapidamente, ao realizar-se a extração em fase sólida no dia seguinte a filtração, as amostras passavam lentamente pelo cartucho e as amostras mais contaminadas com material particulado tendiam a entupi-lo, prolongando a extração. Para a construção da curva, tirou-se a média da absorbância da duplicata dos padrões (Figura 6), e determinou-se a concentração das médias das absorbâncias das amostras a partir da curva construída (Tabela 4); (Figura 7).

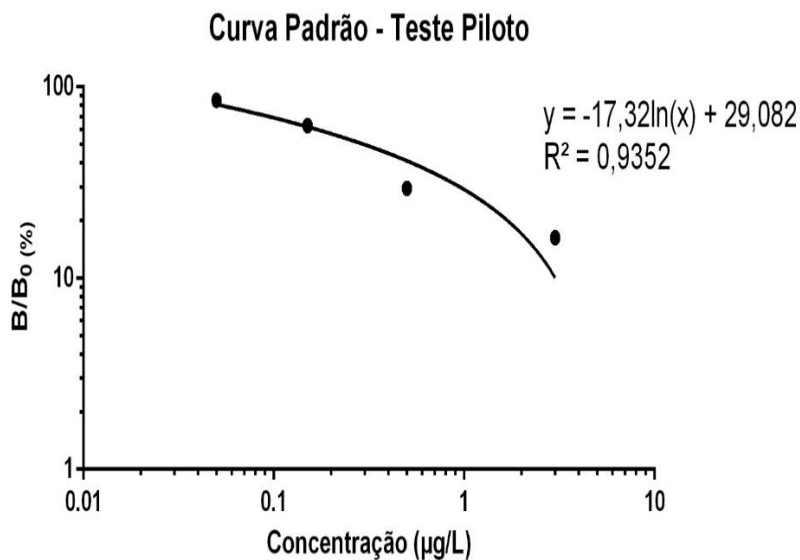


Figura 6: Curva padrão do teste piloto, com equação de reta e R².

Tabela 4: Dados de absorbância, B/B₀ e concentração em ng/L da média da duplicata das amostras piloto

Nome da Amostra	Concentração (ng/L)
Tratada Concentrada	0,01*
Tratada Não-Concentrada	0,001*
Efluente Concentrado	0,70
Efluente Não-Concentrado	0,0008*
Esgoto Concentrado	1,38

Tabela 4 (cont.)	
Esgoto Não-Concentrado	0,002*
Lago Concentrada	0,009*
Lago Não-Concentrado	0,003*

*Valores que ficaram abaixo do limite de quantificação

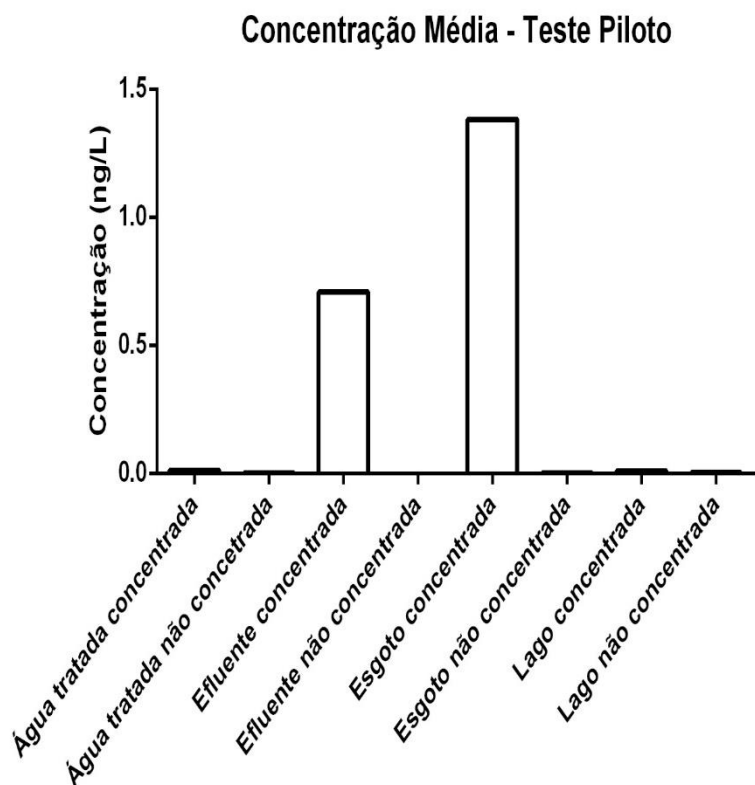


Figura 7: Concentração média do teste piloto.

As amostras do teste piloto que não passaram pela etapa de concentração apresentaram níveis de EE2 abaixo do limite de quantificação da metodologia, enquanto que as amostras que foram concentradas em extração de fase sólida apresentaram valores mais aproximados a faixa de detecção, com exceção da água tratada e da água do lado, que mesmo com a extração ainda apresentaram concentrações de EE2 extremamente baixas para a metodologia. Com base nesses resultados, optou-se por idealizar um desenho

experimental composto por duas filtrações seguidas em membranas de 1 μM , seguidas de uma filtração em membrana de 0,45 μM e extração em fase sólida no mesmo dia da filtração, de tal forma que o processo seja contínuo e os métodos sejam consecutivos. O processo se encerraria apenas na eluição do cartucho com diclorometano, preferindo-se realizar todas as filtrações das amostras para depois fazer uma única eluição, evaporação, ressuspensão e ELISA de todas elas, seguindo-se a finalidade de otimização. As alterações realizadas continuariam sem comprometer o custo do processo como um todo, visto que o mesmo permaneceria mais economicamente viável que os demais ao mesmo tempo que acelera a análise do mesmo.

4.2 Amostras

Para a construção da curva utilizada foram utilizados os valores de média da soma das absorbâncias da duplicata, para as duas leituras realizadas (Figura 8). Os valores de concentrações para cada amostra foram calculados e foram construídas uma figura para as amostras do dia 03/04 (Figura 9), uma figura para o dia 14/06 (Figura 10). Os valores calculados foram plotados em uma tabela na forma de média de concentração da duplicata (Tabela 5). Por fim, foi elaborado mais um gráfico, desta vez somente com as amostras que resultaram em quantidades elevadas de EE2, para se comparar a diferença de perfil do hormônio durante as duas datas (Figura 11).

Ensaio Amostras - Média das absorvâncias das duas leituras e dois poços

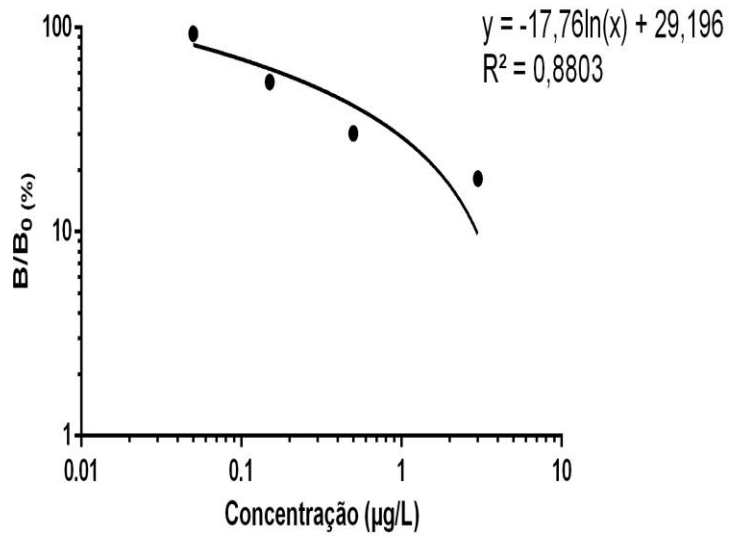


Figura 8: Curva da média das duplicatas dos dois poços, com equação de reta e R^2 .

Concentração Média - Teste das Amostras (03/04)

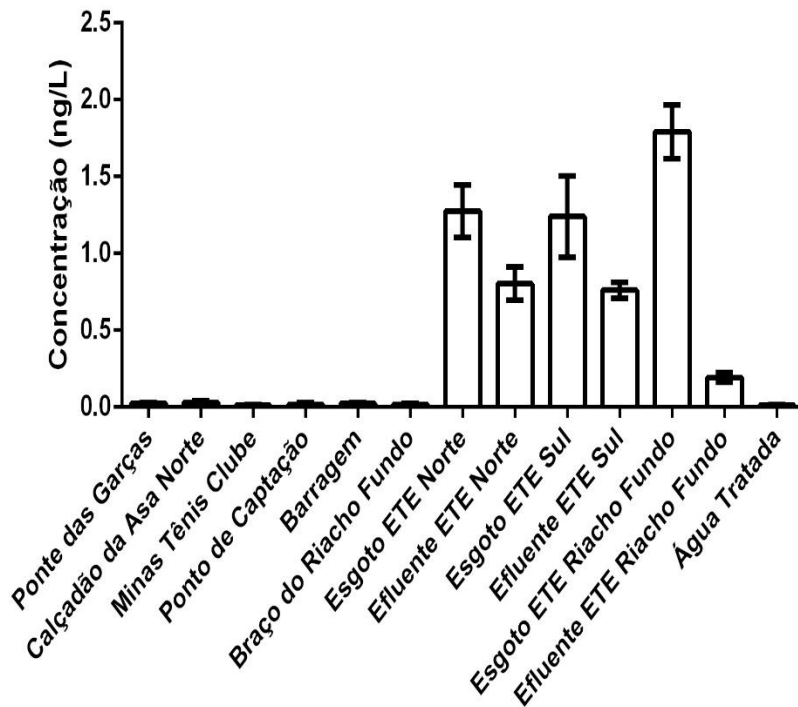


Figura 9: Gráfico da concentração média das amostras coletadas no dia 03/04.

Concentração Média - Teste das Amostras (14/06)

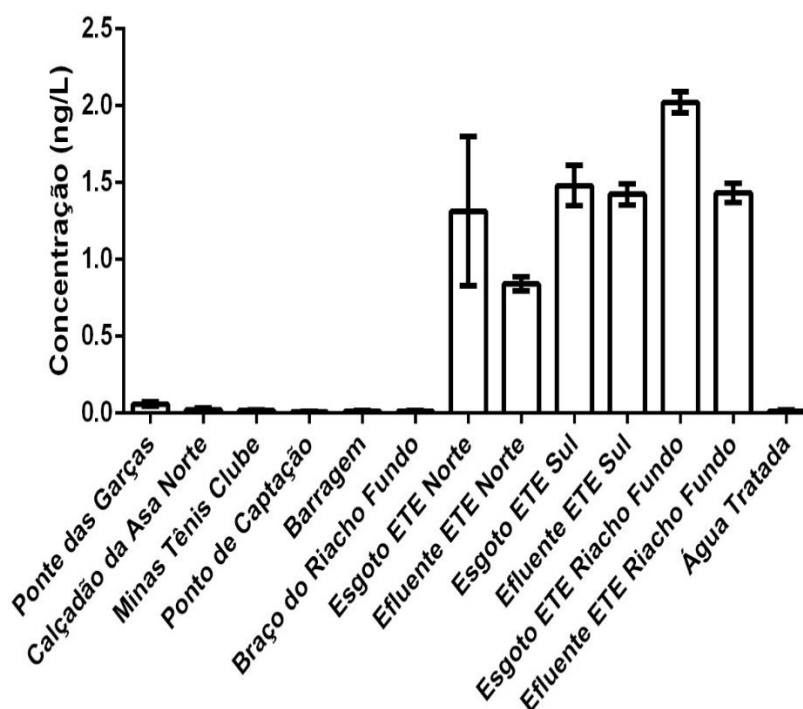


Figura 10: Gráfico da concentração média das amostras coletadas no dia 14/06.

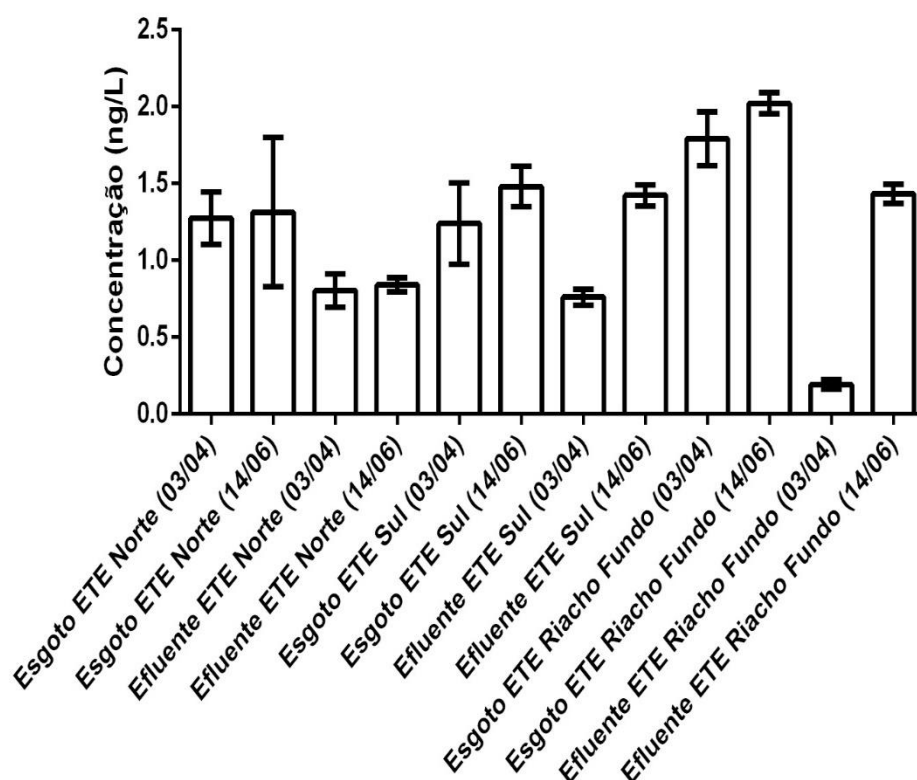
Tabela 5: Data da coleta, absorvância, B/B₀ e média da concentração em ng/L para as amostras.

Nome da Amostra	Data da Coleta	Concentração (ng/L)
Ponte Das Garças (PG)	03/04	0,02*
Ponte Das Garças (PG)	14/06	0,05
Calçadão da Asa Norte (CAN)	03/04	0,03*
Calçadão da Asa Norte (CAN)	14/06	0,02*
Minas Tênis Clube (MTC)	03/04	0,01*
Minas Tênis Clube (MTC)	14/06	0,01*
Ponto de Captação (PC)	03/04	0,01*
Ponto de Captação (PC)	14/06	0,009*
Barragem (BA)	03/04	0,02*
Barragem (BA)	14/06	0,01*
Braço do Riacho Fundo (BRF)	03/04	0,01*
Braço do Riacho Fundo (BRF)	14/06	0,01*
Esgoto ETE Norte (ESEN)	03/04	1,27
Esgoto ETE Norte (ESEN)	14/06	1,31
Efluente ETE Norte (EFEN)	03/04	0,8
Efluente ETE Norte (EFEN)	14/06	0,84
Esgoto ETE Sul (ESSES)	03/04	1,24

Tabela 5 (cont.)

Esgoto ETE Sul (ESES)	14/06	1,48
Efluente ETE Sul (EFES)	03/04	0,76
Efluente ETE Sul (EFES)	14/06	1,42
Esgoto ETE Riacho Fundo (ESRF)	03/04	1,79
Esgoto ETE Riacho Fundo (ESRF)	14/06	2,02
Efluente ETE Riacho Fundo (EFRF)	03/04	0,19
Efluente ETE Riacho Fundo (EFRF)	14/06	1,43
Água Tratada (AT)	03/04	0,01*
Água Tratada (AT)	14/06	0,01*

*Valores que ficaram abaixo do limite de quantificação

Comparação 03/04 e 14/06**Figura 11: Gráfico comparativo dos dois dias de coleta (03/04 e 14/06).**

As amostras no geral não mostraram sofrer mudanças de perfil de EE2 em sua composição ao longo do tempo, com exceção das amostras da ETE Sul e ETE Riacho Fundo, sendo que ambas

aumentaram na segunda coleta. O fenômeno pode ser explicado pela chuva característica da época ser um fator que corroborou para o resultado visto que a mesma auxiliaria no deslocamento de resíduos para a estação de tratamento, todavia pode também ter ocorrido um aumento do uso de anticoncepcionais contendo EE2 em sua composição.

Todos os coeficientes de variação das amostras-teste permaneceram abaixo de 10%, valor preconizado pelo kit como sendo o habitual, com a exceção das amostras do Calçadão da Asa Norte, Esgoto ETE Norte, Esgoto ETE Riacho Fundo (este último somente para a coleta do dia 03/04). Sabendo-se que o volume das amostras pipetadas no poço vieram de uma mesma amostra-mãe coletada e tendo como base os erros já mencionados, a pipetagem incorreta pode ter influenciado no fenômeno.

Observou-se, ao longo dos experimentos, que determinadas amostras demandam um tempo maior de filtração e extração do que outras. As amostras do lago Paranoá, que em sua maior parte resultaram em valores de EE2 abaixo de limite de quantificação, demonstraram ser as matrizes mais de maior tempo de filtração e extração, possivelmente pela presença de material particulado em suspensão que perpassou os poros das membranas, sugerindo-se neste caso mais filtrações para a remoção do material interferente. A presença de moléculas apolares nas amostras do lago pode ter delongado o tempo de extração. No tangente às outras amostras, a matrizes dos esgotos e efluentes levaram tempo mediano para filtrar

devido a elevada composição de material particulado nas matrizes, porém a extração dessas amostras ocorreu de forma acelerada. As amostras das águas tratadas foram filtradas e extraídas rapidamente devido a menor presença de material particulado em suspensão. Os nossos resultados acerca da otimização do processo se mostraram todavia controversos, visto que dependendo da matriz aquática a ser analisada, não seria necessário qualquer tipo de pré-tratamento nas amostras, otimizando ainda mais o tempo e minimizando custos (FARRÉ et al., 2007), (SILVA et al., 2013).

A metodologia de ELISA em conjunto com o protocolo de filtração e extração determinados na etapa prévia de análise das amostras piloto mostrou ser efetiva para a detecção e quantificação de EE2 em amostras com o volume padronizado de 500 mL, conciliando um baixo aumento de custo na metodologia com a inclusão de mais membranas com redução considerável do tempo de extração, enquanto que metodologias como quimiluminescência, radioimunoensaio e sistema mini VIDAS (sistema de imunoensaio fluorescente ligado a enzima) foram economicamente inviáveis para a determinação do hormônio por seu kit ser comercializado somente em grandes quantidades (GUIMARÃES., 2008). Além disso, a praticidade da metodologia do manifold permite realizar no máximo 4 extrações simultaneamente sem a necessidade de fiscalização constante de um profissional adequado, já que a extração decorre de forma automatizada, sendo necessária somente a retirada do líquido de dentro do manifold ao atingir o limite da válvula de vácuo do

equipamento. A reatividade cruzada do anticorpo utilizado mostrou ser baixa para interferentes, conservando a especificidade da metodologia (Tabela 6); (ECOLOGIANA., 2007).

Tabela 6: Reatividade cruzada do anticorpo anti-etinilestradiol usado no ELISA

Composto	Reatividade (%)
Etinilestradiol	100
Estrona (E1)	<0,2
2-Metoxi E1	<0,2
17 β -Estradiol (E2)	<0,2
16-Ceto-E2	<0,2
E2-17-Glicuronídeo	<0,2
E2-3-Glicuronida	<0,2
E2-3-Sulfato-17-Glicuronídeo	<0,2
Estriol (E3)	<0,2
16-Epi-E3	<0,2
E3-16-Glicuronídeo	<0,2

Fonte: Ecologiana, 2007.

Os valores encontrados para a água tratada, se encontrando abaixo do limite de quantificação da metodologia proposta, permitem a suposição de que o tratamento imposto a água é capaz de remover o EE2 das matrizes. Nossos resultados de quantificação de EE2 ficaram abaixo de vários estudos prévios que detectaram quantidades muito maiores, onde foram detectados níveis de 275 ng/L do hormônio em águas tratadas de São Paulo por HPLC-MS/MS (GEROLIN., 2008), 73 ng/L em águas tratadas dos Estados Unidos por CL/MS-ESI, CLEE e GC/MS (KOLPIN et al., 2002), 15

ng/L na Alemanha, 42 ng/L no Canadá em águas de efluentes com GC/MS/MS (TERNES et al., 1999).

Apesar das metodologias utilizadas atualmente para a detecção e quantificação de etinilestradiol serem metodologias específicas, envolvem custo mais elevado de aquisição e manutenção, interferências inconvenientes na leitura das amostras, derivatização e mão de obra capacitada para executá-la, QuEchERS e a própria extração em fase sólida para quantificação de concentrações muito baixas, restringindo em demasia a execução da metodologia (GUISELLI., 2006), (SILVA et al., 2013). Apesar de algumas das metodologias citadas possuírem maior limite de quantificação, observou-se em nossos estudos que as amostras testadas não ultrapassaram o limite de quantificação da metodologia, sugerindo que o ELISA seria a metodologia mais adequada para análise de amostras que abrangem a concentração de 0,05 a 3 µg/L, comprovado juntamente com demais estudos que utilizaram a mesma metodologia e obtiveram êxito na quantificação das amostras dentro da faixa de quantificação (HINTEMANN., 2006), (SILVA et al., 2013).

A análise mostrou uma concentração extremamente baixa na água tratada, indicando que o tratamento para remoção de EE2 foi efetivo em seu objetivo. Concomitantemente, as águas do lago mostraram ter baixos índices de concentração do hormônio, possivelmente por seu grande volume de água, diluindo o analito, e presença de organismos metabolizadores do hormônio dentro do

lago. O nível do analito na água do lago e na água tratada não apresenta efeitos ambientais deletérios por nenhuma bibliografia encontrada, diferentemente das amostras de efluente e de esgoto, onde foi observado um elevado nível de concentração do hormônio, que entre 1 e 2 ng/L é capaz de causar alterações em peixes, visualizado por experimentação em *Danio rerio* (ÖRN et al., 2003).

4 CONCLUSÃO

No presente trabalho, a metodologia de ELISA para detecção do desregulador endócrino 17α -etinilestradiol foi otimizada e padronizada de acordo com os ensaios realizados para as amostras propostas. A metodologia se mostrou adequada para a detecção do hormônio, proporcionando também uma taxa baixa de reações cruzadas em relações a outras metodologias mais utilizadas, mas que ao mesmo tempo possuem um número muito maior de interferentes analíticos. A metodologia proposta permanece sendo a que possui menor custo atualmente, mesmo com a padronização realizada neste estudo, que prevê a utilização de membranas e equipamento para a extração em fase sólida, conservando a alta especificidade observada em outros estudos. É importante ressaltar que as matrizes possuem propriedades diferentes umas das outras que podem vir a demandar um maior tempo dedicado a execução dos métodos de filtração e extração em fase sólida, para remoção de material particulado e concentração das amostras, respectivamente. Todavia,

para matrizes que não necessitariam passar pela etapa de concentração o método se mostrou ainda mais adequado por sua rapidez e baixo índice de intercorrência de interferentes, se caracterizando como uma possível metodologia de escolha para amostras que não precisem de pré-tratamento e que se encontram na faixa de quantificação da metodologia.

Apesar de suas vantagens, o ELISA nas condições propostas pelo estudo precisa ainda ser melhor estudado acerca de seus parâmetros analíticos. A repetibilidade da duplicata de uma mesma amostra ficou prejudicada devido à pipetagem, comprometendo também a linearidade e a robustez, que se mostrou delicada. Mais testes precisam ser realizados com as mesmas amostras descritas nas condições anteriores para se determinar sua exatidão, e diferentes operadores para determinar sua reprodutibilidade. Ademais, sua seletividade se mostrou ser o melhor parâmetro observado pela própria natureza do experimento de induzir uma interação do analito com anticorpos monoclonais, por si só essencialmente específicos quanto á seu epítopo.

A análise proposta revelou um bom tratamento de remoção de 17α -etinilestradiol ao qual as águas são submetidas e um baixo nível da molécula no lago, todavia a água das estações de tratamento de esgoto que é despejada no lago mostrou ter valores altos dos hormônios, tanto antes como depois do tratamento, ambos sendo passíveis de detecção pelo ensaio ELISA.

5. REFERÊNCIAS

ALDA, M. J. L; BARCELÓ, D. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters by liquid chromatography-diode array detection- mass spectrometry. **J. Chromatogr. A.**, set. 2000, v. 892, n. 1-2, p. 391-406.

ALSINA, J. C. I. After 50 years of ethinylestradiol, another oestrogen in combined oral contraceptives. **Eur. J. Contracept. Reprod. Health Care.**, fev. 2010, v. 15, n. 1, p. 1-3.

ANDERSSON, C. *et al.* Effects of 17 α -ethinylestradiol on EROD activity, spiggin and vitellogenin in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). **Aquat. Toxicol.**, jun. 2007, v. 83, n. 1, p. 33-42.

BARONTI, C. *et al.* Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in receiving river water. **Environ. Sci. Technol.**, nov. 2000, v. 34, n. 24, p. 5059-5066.

BARRIONUEVO, W. R; LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em faz sólida (SPME) de piretróides em água. **Quim. Nova.**, nov. 2001, v. 24, n. 2, p. 172-175.

BERG, C. *et al.* The avian egg as a test system for endocrine disrupters: effects of diethylstilbestrol and ethynylestradiol on sex organ development. **Sci. Total Environ.**, ago. 1999, v. 233, n. 1, p. 57-66.

BERTANZA, G. *et al.* Removal on endocrine disrupting compounds from wastewater treatment plant effluents by means of advanced oxidation. **Water Sci. Technol.**, abr. 2010, v. 61, n. 7, p. 1663-1671.

BLUE, S. W. *et al.* Simultaneous quantitation of multiple contraceptive hormones in human serum by LC-MS/MS. **Contraception.**, abr. 2018, v. 97, n. 4, p. 363-369.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Direitos sexuais, direitos reprodutivos e métodos anticoncepcionais.** Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/direitos_sexuais_reprodutivos_metodos_anticoncepcionais.pdf> Acesso em: 17 jul. 2018.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Assistência em planejamento familiar - Manual Técnico.** Disponível em: <<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/0102assistencia2.pdf>> Acesso em: 17 jul. 2018.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Pesquisa nacional de demografia da saúde da mulher e da criança**. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnds_crianca_mulher.pdf> Acesso em: 17. jul. 2018.

CALIMAN, F. A; GRAVILESCU, M. Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting agents in the environment - a review. **Clean (Weinh)**., abr. 2009, v. 37, n. 4-5, p. 277-303.

CARON, E. *et al.* Development of competitive ELISAs for 17 β -estradiol and 17 β -estradiol + estrone + estriol using rabbit polyclonal antibodies. **J. Environ. Sci. Health B.**, fev. 2010, v. 45, n. 2, p. 145-151.

CUNHA, D. L. *et al.* Regulation of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol in water bodies in Europe, the United States, and Brazil. **Cad. Saúde Pública.**, mar. 2016, v. 23, n. 3. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-311X2016000300401&script=sci_arttext&tlng=en> Acesso em: 10 set. 2018.

ECOLOGIENA FOR ENVIRONMENTAL POLLUTANTS. Ethinylestradiol (EE2) ELISA Kit. Disponível em: <<http://www.ecologiena.jp/ee2-e.html>> Acesso em: 18 out. 2018.

EMON, J. M. V. Immunochemical applications in environmental sciences. **J. AOAC. INT.**, fev. 2001, v. 84, n. 1. p. 125-133.

ENGVALL, E; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry.**, fev. 1971, v. 8, n. 9, p. 871-874.

FARRÉ, M. *et al.* Comparative study of an estradiol enzyme-linked immunosorbent assay kit, liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and ultra performance liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry for part-per-trillion analysis of estrogens in water samples. **J. Chromatogr. A.**, ago. 2010, v. 1160, n. 1-2, p. 166-175.

FARIAS, M. R. *et al.* Use of and access to oral and injectable contraceptives in Brazil. **Rev. Saúde Pública.**, nov 2016, v. 50, n. 2, p. 14-24. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102016000300301> Acesso em: 11 set. 2018.

FROBENIUS, W. “The Rabbits are Prepared...” -The development of ethinylestradiol and ethinyltestosterone. **Journal Für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie.**, mai. 2011, v. 8, n. 1, p. 32-57.

GEROLIN, Eleonice Rosa Rossi. Ocorrência e remoção de disruptores endócrinos em águas utilizadas para abastecimento público em Campinas e Sumaré - São Paulo. 2008. 190 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

GUIMARÃES, Tatiane Sant'ana. Detecção e quantificação dos hormônios sexuais 17β -estradiol (B2), estriol (E3), estrona (E1), e 17α -ethinylestradiol (EE2) em água de abastecimento: estudo de caso da cidade de São Carlos, com vistas ao saneamento ambiental. 2008. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

GUISELLI, Gislane. Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP). 2006. 190 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade de Campinas, Campinas, 2006.

HANNAH, R. *et al.* Exposure assessment of 17α -etinilestradiol in surface waters of the United States and Europe. **Environ. Toxicol. Chem.**, dez. 2009, v. 28, n. 12, p. 2725-2732.

HANSELMAN, T. *et al.* Comparison of three enzyme

immunoassays for measuring 17β -Estradiol in flushed dairy manure wastewater. **J. Environ. Qual.**, set. 2004, v. 33, n. 5, p. 1919-1923.

HARDMAN, J. G; GILMAN, L. Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica: 10ª edição. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2003.

HINTEMANN, T. *et al.* Field study using two immunoassays for the determination of estradiol and ethinylestradiol in the aquatic environment. **Water Res.**, jul. 2006, v. 40, n. 12, p. 2287-2294.

HUBACHER, D; TRUSSELL, J. A definition of modern contraceptive methods. **Contraception.**, nov. 2015, v. 92, n. 5, p. 420-421.

JOHNSON, A. C. *et al.* Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. **Sci. Total Environ.**, jul. 2000, v. 256, n. 2-3, p. 163-173.

JOSEPHY, P. D., *et al.* The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates. **J. Biol. Chem.**, abr. 1982., v. 257, n. 7, p. 3669-3675.

JUNOD, S. W; MARKS, L. Women's trials: The approval of the first oral contraceptive pill in the United States and Great Britain. **J. Hist. Med. Allied Sci.**, abr. 2002, v. 57, n. 2, p. 117-160.

KOLPIN, D. W. *et al.* Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in the U. S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. **Environ. Sci. Technol.**, mar. 2000., v. 36, n. 6, p. 1202-1211.

KUCH, H. M; BALLSCHMITER, K. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCl)-MS in the picogram per liter range. **Environ. Sci. Technol.**, ago. 2001, v. 35, n. 15, p. 3201-3206.

LAFLEUR, A. D; SCHUG, K. A. A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous systems. **Anal. Chim. Acta.**, jun. 2011, v. 696, n. 1-2, p. 6-26.

LAUDERSON, J. P. *et al.* Ethinyl Estradiol and other human pharmaceutical estrogens in the aquatic environment: a review of recent risk assessment data. **AAPS Journal.**, mar. 2014, v. 16, n. 2, p. 299-310.

LEECH, D. M. *et al.* Natural organic matter and sunlight accelerate

the degradation of 17 β -estradiol in water. **Sci. Total Environ.**, mar. 2009, v. 407, n. 6, p. 2087-2092.

LIMA, D. L. *et al.* Application of dispersive liquid-liquid microextraction for estrogens quantification by enzyme linked immunosorbent assay. **Talanta.**, jul. 2014, v. 125, n. 1, p. 102-106.

LINTELMANN, J. *et al.* Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). **Pure Applied Chemistry.**, jan. 2003, v. 75, n. 5, p. 631-681.

LIU, R. *et al.* Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A.**, jan. 2004, v. 1022, n. 1-2, p. 179-189.

MANICKUM, T; JOHN, W. The current preference for the immuno-analytical ELISA method for quantitation of steroid hormones (endocrine disruptor compounds) in wastewater in South Africa. **Anal. Bional. Chem.**, jul. 2015, v. 407, n. 17, p. 4949-4970.

MARTINEZ, N. A. *et al.* Modified paramagnetic beads in a microfluidic system for the determination of ethinylestradiol (EE2) in river water samples. **Biosens. Bioelectron.**, fev. 2010, v. 25, n. 6, p. 1376-1381.

MAURÍCIO, R. *et al.* 17 α -ethinylestradiol and 17 β -estradiol removal from a secondary urban wastewater using an RBC treatment system. **Environ. Monit. Assess.**, mai. 2018, v. 190, n. 6, p. 320- 334.

METZLER, M; PFEIFFER, E. Chemistry of Natural and Anthropogenic Endocrine Active Compounds: Endocrine Disruptors, Part I. The Handbook of Environmental Chemistry: 1^a edição. Berlin: Springer-Verlag, 2001.

MORAES., N. V. *et al.* Exposição ambiental a desreguladores endócrinos: alterações na homeostase dos hormônios esteroidais e tireoidianos. **Revista Brasileira de Toxicologia.**, jan. 2008, v. 21, n. 1, p. 1-8.

NADAL, A. *et al.* Endocrine-disrupting chemicals and the regulation of energy balance. **Nat. Rev. Endocrinol.**, set. 2017, v. 13, n. 9, p. 536-546.

NUNES, Camila Ramos Lopez. Avaliação dos efeitos dos fármacos 17- α -etinilestradiol e metformina sobre a reprodução do mexilhão marinho *Perna perna* (Linnaeus, 1758). 2015. 51 f. Dissertação (Mestrado em Sustentabilidade de Sistemas Costeiros e Marinhos) - Universidade Santa Cecília, Santos.

OLSEN, J.M. *et al.* Young women's contraceptive practices: A household survey in the city of São Paulo, Brazil. **Cad. Saúde Pública.**, fev. 2018, v. 34, n.2, p. 1-16. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2018000205011&lng=en&nrm=iso&tlng=en Acesso em: 22 jul. 2018.

ÖRN, S. *et al.* Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. **Aquat. Toxicol.**, dez. 2003, v. 65, n. 4, p. 397-411.

RACZ, L; GOEL, R.K. Fate and removal of estrogens in municipal wastewater. **J. Environ. Monit.**, jan. 2010, v. 12, n. 1, p. 58-70.

RAKHI, J; SUMATHI, M. Contraceptives methods: Needs, options and utilization. **J. Obstet. Gynecol. India.**, dez. 2011, v. 61, n. 6, p. 626-634.

SANTOS, Eliane Prado Cunha Costa. Remoção de etinilestradiol no tratamento de água para consumo humano: estudo em escala piloto. 2011. 169 f. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio-Ambiente e Recursos Hídricos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

SCHOLZ, S; GUTZEIT, H.O. 17- α -ethinylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*). **Aquat. Toxicol.**, out. 2000, v. 50, n. 4, p. 363-373.

SHORE, L. S. *et al.* Induction of phytoestrogen production in *Medicago sativa* leaves by irrigation with sewage water. **Environ. Exp. Bot.**, jul. 1995, v. 35, n. 3, p. 363-369.

SILVA, C. P. *et al.* Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: a review. **Environ. Pollut.**, jun. 2012, v. 165, p. 38-58.

SILVA, C. P. *et al.* Development of ELISA methodologies for the direct determination of 17 β -estradiol and 17- α -ethinylestradiol in complex aqueous matrices. **J. Environ. Manage.**, jul. 2013, v. 30, n. 124, p. 121-127.

SILVA, P. Farmacologia: 8^a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

SNYDER, S. A. *et al.* Pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disruptors in water: Implications for the water industry. **Environ. Eng. Sci.**, set. 2003, v. 20, n. 5, p. 449-469.

SUMPTER, J. P. Endocrine disruptors in the aquatic environment: An overview. **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica.**, abr. 2005, v. 33, n. 1, p. 9-16.

SWART, N; POOL, E. Rapid detection of selected steroid hormones from sewage effluents using an ELISA in the Kuils river water catchment area, South Africa. **J. Immunoassay Immunochem.**, set. 2007, v. 28, n. 4, p. 395-408.

TOKIWA CHEMICAL INDUSTRIES. Ethynylestradiol (EE2) ELISA kit (96 wells). Disponível em: <http://www.abraxiskits.com/wp-content/uploads/2016/04/Ethynylestradiol_EE2_590051_SDS.pdf> Acesso em: 18 nov. 2018.

TERNES, T. A. *et al.* Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – I. Investigation in Germany, Canada and Brazil. **Sci. Total Environ.**, jan. 1999, v. 225, n. 1-2, p. 81-90.

TORRES, Nádia Hortense. Monitoração de resíduos dos hormônios 17α -etinilestradiol, 17β -estradiol e estriol em águas de abastecimento urbano da cidade de Piracicaba, SP. 2009. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo,

São Paulo.

URAIKONG, C. *et al.* A survey of 17 α -ethinylestradiol and mestranol residues in Hawkesbury River, Australia, using a highly specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) demonstrates the levels of potential biological significance. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, out. 2017, v. 144, n. 1, p. 585-592.

VIGANÒ, L. *et al.* Estrogenicity profile and estrogenic compounds determined in river sediments by chemical analysis, ELISA and yeast assays. **Chemosphere.**, out. 2008, v. 73, n. 7, p. 1078-1089.

UNITED NATIONS. **World Family Planning 2017**. Disponível em:

<http://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/family/WFP2017_Highlights.pdf> Acesso em: 11 set. 2018.

YONKERS, K. A. *et al.* Efficacy of a new low-dose oral contraceptive with drospirenone in premenstrual dysphoric disorder. **Obstet. Gynecol.**, out. 2005, v. 16, n.3, p. 492-501.

ZHANG, X. *et al.* Levels of estrogenic compounds in Xiamen Bay sediment, China. **Mar. Pollut. Bull.**, ago. 2009, v. 58, n. 8, p. 1210-1216.

ZHOU, J. L. *et al.* Sorption of selected endocrine disrupting chemicals to different aquatic colloids. **Environ. Sci. Technol.**, jan. 2007, v. 41, n. 1, p. 206-213.