

Quantificação de 17 compostos
desreguladores endócrinos no estuário do
Rio Douro - Avaliação do seu risco para a
biota

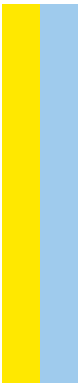
Frederico Nunes Silva

M
2021



Quantificação de 17 compostos desreguladores
endócrinos no estuário do Rio Douro - Avaliação do
seu risco para a biota

Frederico Nunes Silva



Frederico de Nunes e Silva

Quantificação de 17 compostos desreguladores endócrinos no estuário do Rio Douro - Avaliação do seu risco para a biota

Dissertação para o Mestrado de Ciências do Mar – Recursos Marinhos

Especialização em Biologia e Ecologia Marinhas submetido ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto

Orientadora – Maria João Tomé da Costa Sousa da Rocha

Categoria – Professora Auxiliar com Agregação

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Coorientador – Eduardo Jorge Sousa da Rocha

Categoria – Professor Catedrático

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Porto, 2021

Agradecimentos

Gostava de começar por agradecer em especial à orientadora de mestrado, a Professora Maria João Rocha, pois sem a sua ajuda, dedicação e força de vontade contagiante não seria possível acabar este projeto. Por isso, um muitíssimo obrigado!

De seguida, quero agradecer a todos aqueles que de uma maneira ou outra contribuíram para que este projeto esteja finalmente realizado.

À minha família por todos os esforços que fizeram para me tornar na pessoa que sou hoje e por me darem a possibilidade de ter acesso a este tipo de educação. Isto é para vocês.

A todos os meus amigos que estão do meu lado durante todos estes anos.

Aos meus companheiros de mestrado, por todas as aventuras que passamos juntos e por todo o apoio que me deram.

À minha amiga Gina, um grande obrigado, por fazer esta caminhada académica ao meu lado e por toda a disponibilidade!

A todos mais uma vez, muito obrigado por tudo!

Por fim, agradeço também o apoio financeiro do ICBAS - U. PORTO, por meio do seu Mestrado em Ciências Marinhas - Recursos Marinhos. Esta Dissertação também beneficiou da participação no projeto ATLANTIDA - Plataforma de Monitorização do Oceano Atlântico Norte e Ferramentas para Exploração Sustentável dos Recursos Marinhos (NORTE-01-0145-FEDER-000040), apoiado pela Norte Portugal Programa Operacional Regional (NORTE 2020), no âmbito do Acordo de Parceria PORTUGAL 2020, através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER). Os esforços dos autores foram apoiados adicionalmente pelo Financiamento Estratégico UID/Multi/04423/2019 através

de fundos nacionais disponibilizados pela FCT e FEDER ao CIIMAR/CIMAR, no âmbito do programa PT2020.

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

FCT

Fundação para a Ciência e a Tecnologia

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, INOVAÇÃO E DO ENSINO SUPERIOR

Cofinanciado por:



UNIÃO EUROPEIA

Fundo Europeu
de Desenvolvimento Regional

Índice

Resumo	7
Abstract	9
Lista de abreviaturas	11
Capítulo 1	13
1. Introdução	13
2. Principais objetivos da dissertação	17
Capítulo 2	19
1. Reagentes químicos e outros materiais	19
2. Padrões de referência	19
3. Amostragem e preparação das amostras de água	20
3.1. Pontos de recolha de amostras na margem norte do estuário do Rio Douro	21
3.2. Pontos de recolha de amostras na margem sul do estuário do Rio Douro	22
4. Extração dos EDCs das amostras de água	24
5. Quantificação por GC-MS	26
6. Atividade estrogénica e avaliação de risco	27
7. Análise estatística	28
Capítulo 3. Resultados	29
1. Estrogénios	29
2. Fitoestrogénios e sitosterol	31
3. Compostos industriais	33

4. Resultados físico-químicos	36
Capítulo 4. Discussão	39
1. Estrogénios	39
2. Fitoestrogénios e sitosterol	40
3. Compostos industriais	41
5. Parâmetros físico-químicos	43
Conclusões	44
Referências bibliográficas	45

Resumo

Nos últimos anos, diversos organismos aquáticos capturados no estuário do Rio Douro, têm mostrado sinais fisiológicos claros (e.g., ovotestis) de estarem a ser afetados por impactos de origem antropogénica, e, em particular, pela presença de compostos desreguladores endócrinos (EDCs).

De entre os diferentes grupos de EDCs, os estrogénios, fitoestrogénios, sitosterol e poluentes de origem industrial são compostos considerados de elevada relevância devido à sua atividade e abundância em águas superficiais.

Em organismos aquáticos estes compostos são capazes de causar a disrupção do sistema endócrino ao alterarem o seu balanço hormonal regular, levando a vários problemas de saúde, incluindo deficit do crescimento, e desenvolvimento harmonioso dos sistemas imunitário, reprodutivo, entre outros.

Logo, um dos objetivos deste estudo foi determinar as concentrações e a disseminação de dezassete compostos desreguladores endócrinos (EDCs) no estuário do Rio Douro no sentido de avaliar a qualidade da água neste habitat. Paralelamente, também foram avaliados alguns parâmetros físico-químicos, associados à pressão antropogénica (pH, nitritos, nitratos, amónia e fosfatos) nestas águas.

Assim, as amostras de água foram recolhidas no estuário do rio Douro ao longo de um ano ($n = 4$), considerando dez locais de amostragem. Estes estavam localizados nas margens norte ($n = 5$) e sul ($n = 5$) do estuário.

Os EDCs analisados incluíram a determinação de estrogénios como a estrona (E_1), estradiol (E_2) e etinilestradiol (EE_2). Também se determinaram a concentração de compostos de origem vegetal como a daidzeína (DAID), genisteína (GEN), biocanina A (BIO-A), formononetina (FORM), e o sitosterol (SITO) e de vários poluentes de origem industrial. De entre estes últimos foram selecionados, o bisfenol A (BPA) os alquilfenóis etoxilados (APEOs), como o octilfenol mono e dietoxilado (OP_1EO , OP_2EO) e o nonilfenol mono e dietoxilado (NP_1EO , NP_2EO), e seus derivados não etoxilados, os alquilfenóis (APs), considerados muito perigosos para a biota. Relativamente aos APs foram avaliados os derivados do octilfenol (OPs), 4-n-octilfenol (OP), 4-t-octilfenol (4-t-OP), e do nonilfenol (NPs) como o 4-nonilfenol (4-NP), e 4-n-nonilfenol (4-n-NP).

Assim, após a determinação dos parâmetros físico-químicos supracitados, os EDCs presentes em cada 1 L de água de cada local foram extraídos e pré-concentrados (4000 x) através de um método de extração em fase sólida (Solid-Phase Extraction – SPE), previamente implementado no nosso laboratório.

Como os EDCs em estudo são pouco voláteis, estes foram derivados com BSTFA + 1% TMS e posteriormente analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

Todos os EDCs ensaiados mostraram uma alta taxa de detecção (em média 97%), mostrando sua ubiquidade neste estuário.

A determinação de quantidades biológicas relevantes de estrogénios (até 8,5 ng/L para E₂), fitoestrogénios (até 827 ng/L para BIO-A) e poluentes industriais (até 2,7 µg/L para nonilfenol dietoxilado, NP₂EO) demonstra um risco de desregulação endócrina para a vida selvagem aquática local.

Como outro dos objetivos deste estudo foi avaliar o risco potencial que estes compostos apresentam para a biota, transformando os resultados anteriores em equivalentes de E₂ (E₂-EQs) verificamos que este habitat apresenta o equivalente a 25 ng/L de E₂, o que é mais do que suficiente para induzir a desregulação endócrina em organismos aquáticos. O cálculo do quociente de risco (HQ) de 55, corrobora a última observação e quantifica-o em termos numéricos. Assim, este valor de HQ sugere um potencial considerável para efeitos adversos da biota local.

Além disso, também os resultados físico-químicos sugerem um potencial impacto promovido por descargas diretas de esgotos, e ainda provavelmente de embarcações turísticas no estuário do Rio Douro.

Em conjunto, tanto a quantificação dos EDCs como dos parâmetros físico-químicos sugerem haver duas zonas críticas neste estuário. Na margem norte a área localizada perto da ETAR do Freixo, e na sul a zona perto da ETAR de Febros.

Portanto, os resultados obtidos neste estudo permitem-nos sugerir haver condições para a ocorrência de desregulação endócrina da fauna local neste estuário bem como potenciais efeitos deletérios para a saúde humana que entra em contato direto (praias fluviais) ou indiretamente (alimentos) com os compostos investigados.

Abstract

In recent years, several aquatic organisms captured in the Douro River estuary have shown clear physiological signs (e.g., ovotestis) of being affected by impacts of anthropogenic origin and, in particular, by the presence of endocrine-disrupting compounds (EDCs).

Among the different groups of EDCs, estrogens, phytoestrogens, sitosterol, and industrial pollutants are compounds considered highly relevant due to their activity and abundance in surface waters.

In aquatic organisms, these compounds can disrupt the endocrine system by altering their regular hormonal balance, leading to various health problems, including growth deficit and harmonious development of the immune and reproductive systems, among others. Therefore, one of the objectives of this work was to determine the concentrations and spread of seventeen endocrine disrupting compounds (EDCs) in the Douro River estuary.

Therefore, one of the objectives of this work was to determine the concentrations and spread of seventeen endocrine disrupting compounds (EDCs) in the Douro River estuary to assess the water quality in this habitat. In parallel, some physicochemical parameters associated with anthropogenic pressure (pH, nitrites, nitrates, ammonia and phosphates) in these waters were also evaluated. Thus, water samples were collected in the Douro River estuary over a year ($n = 4$), considering ten sampling sites. These were located on the north ($n = 5$) and south ($n = 5$) margins of the estuary.

The EDCs analysed included the determination of estrogens such as estrone (E1), oestradiol (E₂) and ethinylestradiol (EE₂). The concentration of compounds of plant origin such as daidzein (DAID), genistein (GEN), biochanin A (BIO-A), formononetin (FORM), and sitosterol (SITO) and various pollutants of industrial origin were also determined. -al. Among the latter, bisphenol-A (BPA), ethoxylated alkylphenols (APEOs) were selected, such as mono and diethoxylated octylphenol (OP₁EO, OP₂EO) and mono and diethoxylated nonylphenol (NP₁EO, NP₂EO), and their non-ethoxylated derivatives, the alkylphenols (APs), considered very dangerous for the biota. Regarding APs, derivatives of octylphenol (OPs), 4-n-octylphenol (OP), 4-t-octylphenol (4-t-OP), and nonylphenol (NPs) such as 4-nonylphenol (4-NP) and 4-n-nonylphenol (4-n-NP) were evaluated.

Thus, after determining the aforementioned physicochemical parameters, the EDCs present in each 1 L of water at each location were extracted and pre-concentrated (4000 x) using a solid phase extraction method (Solid-Phase Extraction – SPE), previously implemented in our laboratory.

Since the EDCs under study are not volatile, they were derivated with BSTFA + 1% TMS and later analysed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS).

All tested EDCs showed a high detection rate (on average 97%), showing their ubiquity in this estuary. The discovery of biologically relevant amounts of estrogens (up to 8.5 ng/L for E_2), phytoestrogens (up to 827 ng/L for BIO-A) and industrial pollutants (up to 2.7 µg/L for diethoxylated nonylphenol, NP₂EO) demonstrates a risk of endocrine disruption to local aquatic wildlife.

As another of the objectives of this study was to evaluate the potential risk that these compounds present to the biota, transforming the previous results into E_2 equivalents (E_2 -EQs), it was verified that this habitat presents the equivalent of 25 ng/L of E_2 , which is more than enough to induce an endocrine disruption in aquatic organisms. The risk quotient (HQ) calculation of 55 corroborates the last observation and quantifies the risk in numerical terms. Thus, this HQ value suggests considerable potential for adverse effects from the local biota.

Furthermore, the physicochemical results also suggest a potential impact promoted by direct discharges from sewage and probably also from tourist vessels in the Douro River estuary.

Together, both the quantification of EDCs and the physicochemical parameters suggest two critical zones in this estuary. On the north bank, the area located near the Freixo wastewater treatment plant (WWTP), and on the south, the area close to the Febros WWTP.

Therefore, the results obtained in this study allow us to suggest that there are conditions for the occurrence of endocrine disruption of the local fauna in this estuary as well as potential harmful effects for human health that come into direct contact (river beaches) or indirectly (food) with the investigated compounds.

Lista de Abreviaturas

4-n-NP - 4-n-Nonilfenol

4-NP - Nonilfenol

4-OP - 4-Octilfenol

4-t-OP - 4-tert-Octilfenol

ANOVA - Análise de variância

APEOs - Alquilfenóis polietoxilatos

APs - Alquilfenóis

BIO-A - Biocanina A

BPA - Bisfenol A

BSTFA - N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

TMCS - Trimetilclorossilano

DAID - Daidzeína

E₁ - Estrona

E₂ - Estradiol

E₂-EQs – Equivalentes de estradiol

EDCs – Compostos desreguladores endócrinos

EE₂ - Etinilestradiol

ETAR- Estação de tratamento de águas residuais

FORM - Formononetina

GC-MS- Cromatografia gasosa - Espectrómetro de massa

GEN- Genisteína

HQ – Hazard Quotient

MEC - Concentração ambiental

NP₁EO - Nonilfenol monoetoxilado

NP₂EO- Nonilfenol dietoxilado

OP₁EO - Octilfenol monoetoxilado

OP₂EO - Octilfenol dietoxilado

PI - Padrões internos

PNEC - Predicted No-Effect Concentration

PSU - Unidade de salinidade prática

SITO - Sitosterol

SPE - Solid-Phase Extraction

Capítulo 1.

1. Introdução

Um dos temas mais abordados na atualidade são as alterações climáticas, e devido a estas, a União Europeia (UE) tem tido um principal interesse no estudo da água potável devido à sua possível e preocupante escassez (www.unwater.org). Uma vez que a maioria dos rios da UE fluem entre diferentes países, a legislação comunitária tentou padronizar a sua qualidade criando a Diretiva-Quadro da Água, DQA (WFD 2000). Este decreto foi atualizado e adaptado ao longo dos anos. Ainda assim, a sua implementação tem sido desafiadora, pois nem todos os membros da UE cumprem as diretrizes estabelecidas para alcançar uma boa qualidade das suas águas, que leva em consideração tanto seu estado ecológico quanto químico (Moss et al., 2020).

O Rio Douro é um dos exemplos acima referidos onde a aplicação da DQA tem sido complexa devido ao seu carácter internacional. Ao longo do seu percurso (ca. 900 km), este rio passa por inúmeras zonas agrícolas e industriais, e nos seus últimos 22 km o seu estuário está rodeado pela Grande cidade do Porto.

Este estuário, tal como outros referidos na bibliografia (Rocha and Rocha 2015) é uma área altamente propensa a ser afetada por produtos químicos produzidos a montante ou dentro do mesmo. Devido a esse problema, estudos anteriores demonstraram a presença de elevadas concentrações de poluentes e compostos desreguladores endócrinos (EDCs) nesta área (Rocha et al., 2013).

O termo desregulador endócrino foi introduzido pela primeira vez nos anos 90 (Colburn et al., 1996) e caracteriza as substâncias químicas, naturais ou antropogénicas, capazes de interferirem com o sistema endócrino dos organismos. Estes poluentes, produzem efeitos adversos no desenvolvimento, na reprodução e em funções neurológicas e imunológicas, tanto em seres humanos como em outros animais terrestres e aquáticos.

Os EDCs atuam via recetores celulares e interferem com as vias enzimáticas envolvidas na biossíntese e/ou no metabolismo de substratos endógenos (incluindo hormonas sexuais), mimetizando a ação das hormonas endógenas. Nesta linha a Organização

Mundial da Saúde (OMS) também definiu em 2002 um desregulador endócrino como sendo uma “*substância ou mistura de substâncias que alteram uma ou várias funções do sistema endócrino e têm, conseqüentemente, efeitos adversos sobre a saúde num organismo intacto, na sua descendência, ou nas (sub)populações*” (www.who.int/ceh/publications/).

No meio aquático, a origem mais provável destes compostos é a presença de efluentes de estações de tratamento de águas residuais (ETARs), esgotos não tratados, e escoamentos agrícolas (Rocha et al., 2012; Rocha et al., 2013).

Por outro lado, os quebra-mares construídos em 2008 na foz do estuário, projetados para proteger a cidade do Porto das adversidades do Oceano Atlântico, diminuíram o contacto entre a água do estuário e a do mar e aumentaram o tempo de residência, bem como as concentrações dos EDCs neste local (Bettencourt et al., 2009; Rocha et al., 2012; Rocha et al., 2013).

Sendo o Rio Douro uma importante fonte de água potável (<https://www.adp.pt/en/>), este estudo pretende investigar a aplicação adequada da DQA nesta área. Para tal, serão considerados alguns dos EDCs mais preocupantes para a saúde humana e ambiental (Rocha et al., 2013). Estes incluem compostos como estrogénios, fitoestrogénios, sitosterol (SITO) e compostos industriais como o bisfenol A (BPA), octilfenóis (OPs), nonilfenóis (NPs) e seus alquilfenóis polietoxilatos (APEOs). Salienta-se que vários destes produtos químicos são “*substâncias prioritárias no domínio da política da água*” (Commission, 2001) devido à sua toxicidade e persistência ambiental.

Relativamente aos estrogénios de origem natural e sintética iremos avaliar os seguintes compostos (**Tabela 1**).

Estrona (E_1) - Estrogénio natural muito potente. É naturalmente produzido tanto pelos animais terrestres como aquáticos. Em baixas concentrações (ng/L - µg/L) esta hormona pode ser tóxica, cancerígena e/ou um forte promotor de crescimento celular. Além disto a E_1 pode ter efeitos nocivos para a reprodução, incluindo inibição da implantação de ovos, supressão da espermatogénese e impotência (Lewis 1990). É excretada pela urina e fezes, acabando por entrar nos ecossistemas a partir dos efluentes de esgotos (Routledge et al., 1998).

Estradiol (E_2) - É o estrogénio natural mais ativo (Wei et al., 2007). E_2 entra nos organismos através de alimentos e águas contaminadas e interfere com os processos

fisiológicos normais (Ying et al., 2002). Por exemplo, E₂ pode afetar o sistema reprodutivo masculino interferindo no seu crescimento e função o que promove o declínio da taxa de natalidade e aumento da incidência de tumores testiculares (Changa et al., 2009).

Etinilestradiol (EE₂). É uma hormona estrogénica sintética de elevada potência. É amplamente utilizada em contraceptivos orais e apresenta uma atividade 1,3 x superior à do E₂ (Aris et al., 2014).

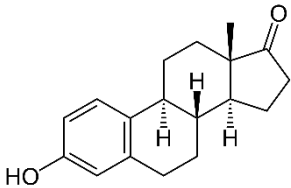
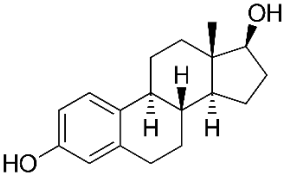
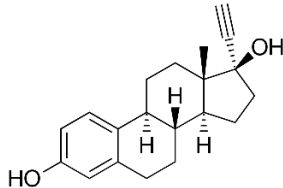
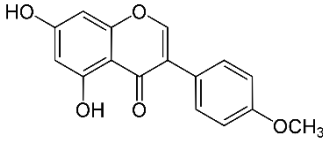
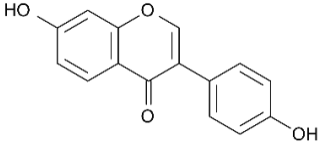
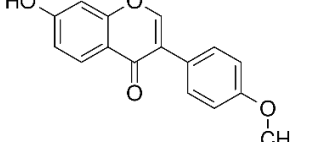
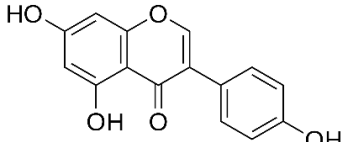
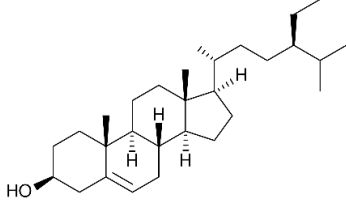
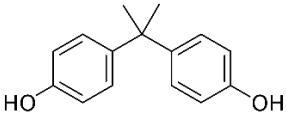
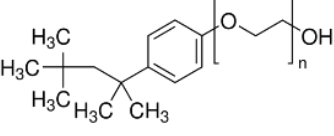
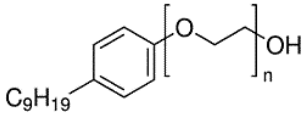
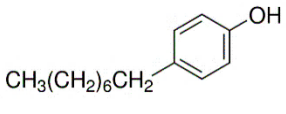
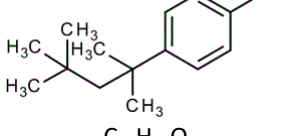
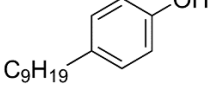
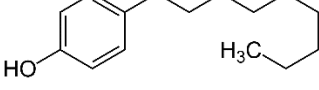
Daidzeína (DAID), genisteína (GEN), biocanina A (BIO-A) e a formononetina (FORM) são compostos estrogénicos de origem vegetal que fazem parte dos primeiros intermediários da via metabólica das isoflavonas (**Tabela 1**). Estes, são compostos orgânicos predominantes na família Fabaceae (Harborne 2000), como a soja. Demonstrou-se que apresentam uma vasta variedade de efeitos dose-dependentes que tanto podem ser benéficos como prejudiciais à saúde (Cos et al., 2003).

O sitosterol (SITO) é um fitoesterol e a sua estrutura molecular é semelhante à do colesterol (**Tabela 1**), o que pode inibir absorção intestinal deste esteroide baixando a sua concentração no sangue o que pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares (Ostlund 2004). No entanto, em concentrações elevadas o SITO também atua como EDC já que tem a capacidade de interferir com a síntese hormonal normal (Ostlund 2004).

Relativamente aos xenoestrogénios de origem industrial o bisfenol A (BPA) tornou-se onnipresente no ambiente nos últimos 80 anos devido à sua presença numa infinidade de produtos plásticos e seus derivados (Staples et al., 1998). À medida que a procura destes produtos aumentou, também aumentou a produção de BPA. Em 1964, foram produzidas 42 toneladas de BPA nos Estados Unidos (Tsai, 2006). Em 2003, a produção global de BPA era de 3,2 milhões de toneladas (Tsai, 2006). O BPA é um xenoestrogénio não esteroide que exhibe aproximadamente 10⁻⁴ a atividade do E₂ (Witorsch, 2002).

Os alquilfenóis polietoxilados APEOs, como o octilfenol mono e dietoxilado (OP₁EO, OP₂EO) e nonilfenol mono e dietoxilado (NP₁EO, NP₂EO), são um grupo de tensoativos não-iónicos que são amplamente utilizados como detergentes, emulsionantes, estabilizadores, entre outros e funcionam como intermediários na síntese de surfactantes aniónicos (**Tabela 1**). Segundo alguns estudos estas substâncias são degradadas em produtos mais tóxicos como os alquilfenóis (APs) (Stephanou & Giger 1982). De entre os APs, destacamos o 4-n-octilfenol (4-n-OP), 4-t-octilfenol (4-t-OP), 4-nonilfenol (4-NP), e 4-n-nonilfenol (4-n-NP) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Fórmulas estruturais e moleculares dos dezassete EDCs avaliados neste estudo.

Estrogénios Origem Animal e Farmacêutica	Estrona (E ₁)	Estradiol (E ₂)	Etinilestradiol (EE ₂)
			
	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	C ₂₀ H ₂₄ O ₂
Fitoestrogénios Origem Vegetal	Biocanina A (BIO-A)	Daidzeína (DAID)	Formononetina (FORM)
			
	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	C ₁₆ H ₁₂ O ₄
Fitoestrogénio Origem Vegetal	Genisteína (GEN)	Sitosterol (SITO)	
			
	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	C ₂₉ H ₅₀ O	
Xenoestrogénios Origem Industrial	Bisfenol A (BPA)	Octilfenol mono (OP ₁ EO) e dietoxilado (OP ₂ EO)	Nonilfenol mono (NP ₁ EO) e dietoxilado (NP ₂ EO)
			
	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	C ₈ H ₁₇ C ₆ H ₄ (OCH ₂ CH ₂) _n OH	C ₉ H ₁₉ C ₆ H ₄ (OCH ₂ CH ₂) _n OH
	4-n-Octilfenol (4-n-OP)	4-t-Octilfenol (4-t-OP)	
			
	C ₁₄ H ₂₂ O	C ₁₄ H ₂₂ O	
	4-Nonilfenol (4-NP)	4-n-Nonilfenol (4-n-NP)	
			
	C ₉ H ₁₉	C ₁₅ H ₂₄ O	

Para determinar os montantes globais dos EDCs acima referidos em águas superficiais foi considerado o uso de protocolos analíticos previamente desenvolvidos no nosso laboratório (Rocha et al., 2013). Estes envolvem a extração de EDCs da matriz estuarina por extração em fase sólida (SPE) seguida da sua quantificação por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa (GC-MS).

2. Principais objetivos da dissertação

Os principais objetivos deste estudo foram:

1. Atualizar o estado da qualidade da água do estuário do rio Douro.

Para tal, foram avaliadas as atuais concentrações de EDCs em dez pontos de amostragem, distribuídos entre as duas margens do estuário, durante um ano e foram determinados vários parâmetros físico-químicos também relacionados com a qualidade da água como pH, nitritos, nitratos, amónia e fosfatos.

2. Avaliar potenciais riscos para a saúde de peixes expostos às águas do estuário do rio Douro.

Para tal foram utilizadas várias ferramentas matemáticas, incluindo o cálculo de equivalentes de estradiol (E_2 - EQs) e quocientes de risco (HQs) (Wentzel et al., 1996).

3. Identificar as principais fontes de EDCs no estuário do rio Douro.

Capítulo 2. Material e Métodos

1. Reagentes químicos e outros materiais

Todos os produtos químicos usados apresentaram grau analítico. O hexano, a piridina anidra, e o *N,O*-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) adicionado com 1% (*m/v*) de trimetilclorosilano (TMCS) foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). O diclorometano e o metanol foram da Romil Ltd. (Cambridge, UK).

A água ultrapura foi provida por um sistema de água Milli-Q (condutividade = 0,054 $\mu\text{S} / \text{cm}$, a 25 °C).

Os cartuchos SPE de 200 mg Oasis HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance) eram da Waters Corporation (Milford, MA, EUA).

Os cartuchos de sílica de 1000 mg foram fornecidos pela Teknokroma (Barcelona, Espanha).

2. Padrões de referência

Todos os estrogénios (E_1 , E_2 , EE_2), fitoestrogénios (BIO-A, DAID, FORM, GEN), SITO e a maioria dos compostos industriais (OPs, NPs e APEOs) e padrões internos (PIs), ou seja, 17β -estradiol- d_2 (E_2 - d_2) e bisfenol-A- d_{16} (BPA- d_{16}) foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Os isómeros de nonilfenol (NP) e 4-n-NP e foram fornecidos por Riedel-de-Haën (Seelze-Hannover, Alemanha).

A solução mãe (100 mg/L em metanol de todos os EDCs) foi armazenada no escuro a - 20 °C, não apresentando qualquer tipo de deterioração durante um ano. As curvas de calibração utilizaram seis níveis de concentração, variando entre 10 e 300 ng/L. As concentrações de ambos os PIs, E_2 - d_2 e BPA- d_{16} , foram de 50 ng/L (Rocha et al., 2013).

3. Amostragem e preparação das amostras de água

Amostras de águas superficiais (2 L) foram coletadas em maré baixa (**Tabela 2**) em dez áreas do estuário do Rio Douro (**Figura 1**). A amostragem ocorreu em fevereiro (inverno), maio (primavera), julho (verão) e novembro (outono) de 2019 em garrafas de vidro âmbar de 2,5 L. Estas foram previamente lavadas em laboratório, passadas por água ultrapura. Posteriormente, *in loco*, antes de cada colheita as garrafas foram lavadas com a água de cada ponto.

Aqui, os locais de amostragem S_1 a S_5 e S_6 a S_7 localizam-se, respetivamente, nas margens norte e sul do estuário do rio Douro.

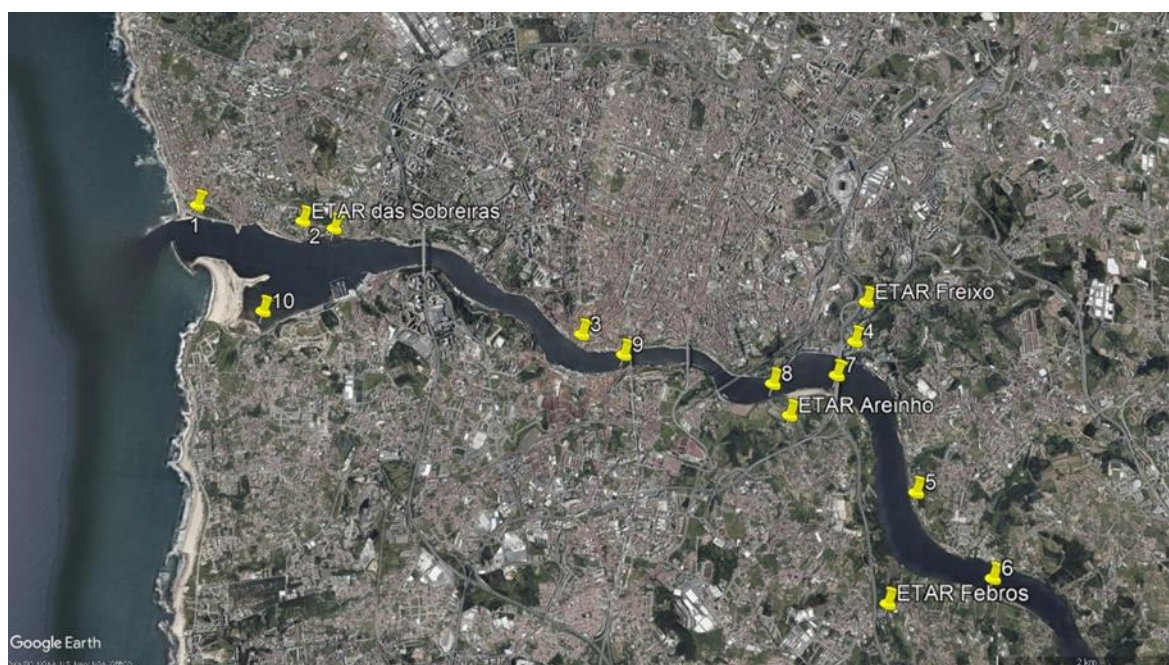


Figura 1. Localização dos pontos de amostragem no estuário do rio Douro (S_1 a S_{10}), Portugal (adaptado de Google Maps).

Tabela 2. Dias, horas e altura das marés observadas durante as colheitas de água efetuadas no estuário do Rio Douro.

Data	Hora	Altura da maré (m)
20-fev-2019	09:26	0,2
06-mai-2019	10:36	0,6
22-jul-2019	11:00	1,3
15-nov-2019	10:15	0,7

3.1. Pontos de recolha de amostras na margem norte do estuário do Rio Douro

S₁ (41°08'50.5"N8°40'24.1"W) (**Figura 2**) - Localizado na foz do Rio Douro na praia do Farol.



Figura 2. Ponto de colheita S₁.

S₂ (41°08'52.0"N8°39'12.7"W) (**Figura 3**) – Observatório de Aves do estuário do rio Douro, perto da saída do local de descarga da ETAR das Sobreiras, a qual é responsável por tratar dos efluentes urbanos de cerca de 200.000 habitantes (<https://www.aguasdoporto.pt/etar/etar-sobreiras>).



Figura 3. Ponto de colheita S₂.

S₃ (41°08'24.5"N8°36'58.8"W) (**Figura 4**) – Este local está na área urbana do estuário e é equidistante da ETAR das Sobreiras e da ETAR do Freixo.



Figura 4. Ponto de colheita S₃.

S₄ (41°08'37.6"N8°34'47.0"W) (**Figura 5**) – Posicionado na saída de água do efluente da ETAR do Freixo, esta estação é responsável pelo tratamento de água de cerca de 170.000 habitantes (<https://www.aguasdoporto.pt/etar/etar-freixo>).



Figura 5. Ponto de colheita S₄.

S₅ (41°08'13.6"N8°34'18.7"W) (**Figura 6**) – Localizado na zona mais interna do estuário do Rio Douro não parece exibir fontes de poluição antropogénica.



Figura 6. Ponto de colheita S₅.

3.2. Pontos de recolha de amostras na margem sul do estuário do Rio Douro

S₆ (41°07'18.8"N8°33'27.2"W) (**Figura 7**) – Localizado aproximadamente na mesma zona do ponto S₅ mas na margem Sul. Este ponto, tal como o anterior, não apresenta aparentes fontes de poluição e situa-se na praia fluvial do Areínho de Avintes.



Figura 7. Ponto de colheita S₆.

S₇ (41°08'23.4"N8°34'56.5"W) (**Figura 8**) – Localizada perto de num efluente da ETAR de Febros, a qual trata os efluentes urbanos de cerca de 80.000 habitantes (<https://www.simdouro.pt/dados.php?ref=etarfebros>).



Figura 8. Ponto de colheita S₇.

S₈ (41°08'23.4"N8°34'56.5"W) (**Figura 9**) – Situado a sul do efluente da ETAR do Are-ínho (<https://www.simdouro.pt/dados.php?ref=etarareinho>) a qual trata os efluentes de cerca de 31.000 habitantes.



Figura 9. Ponto de colheita S₈.

S₉ (41°08'20.3"N8°36'36.9"W) (**Figura 10**) – Cais de Gaia por baixo da Ponte D. Luís, é uma zona bastante turística, com um grande tráfego marítimo.



Figura 10. Ponto de colheita S₉.

S₁₀ (41°08'12.0"N8°39'39.8"W) (**Figura 11**) – Área de Reserva Natural do estuário perto da praia do Cabedelo. É uma área protegida de acesso restrito.



Figura 11. Ponto de colheita S₁₀.

Após a amostragem (a 1 m de profundidade), a temperatura (°C) e a salinidade foram medidas *in situ*. As águas foram transportadas para o laboratório a 4 °C, e os teores de nitritos (NO₂⁻), nitratos (NO₃⁻), amónia (NH₄⁺) e fosfatos (PO₄²⁻) foram medidos por fotometria (pHotoFlex® STD Colorimeter WTW). Para o último propósito, foram usados kits de avaliação certificados, e todas as amostras e brancos foram analisados em triplicado para garantir a precisão analítica.

Para a quantificação de EDCs, as amostras foram filtradas para eliminar qualquer matéria em suspensão através de um filtro de fibra de vidro de 0,45 µm (Millipore, Irlanda). O resultado dos filtrados foi acidificado com H₂SO₄ até se atingir um pH 2 e foram sujeitos a SPE nas seguintes 24 h. Durante esta fase as amostras foram mantidas no escuro e a uma temperatura de ± 4 °C até serem extraídas.

4. Extração dos EDCs das amostras de água

A extração dos EDCs foi realizada por SPE usando cartuchos OASIS HLB adaptados a um dispositivo de vácuo para SPE off-line (**Figura 12**), tendo sido seguido um protocolo desenvolvido por Rocha et al. (2013). O primeiro passo envolve o condicionamento dos cartuchos com 10 mL de diclorometano:metanol CH₂Cl₂:CH₃OH (50:50 v/v), seguido de 6 mL de metanol CH₃OH e 13 mL de água destilada ultrapura a um ritmo de 1 mL por minuto.

No passo seguinte as amostras de água (1 L), adicionadas de PIs foram passadas pelos cartuchos a uma velocidade constante de 5 mL/min.

O terceiro passo requereu uma limpeza com 13 mL de água ultrapura e 1 mL de metanol seguida de secagem dos cartuchos durante 30 min. Finalmente procedeu-se à eluição dos EDCs com 10 mL de diclorometano:metanol (50:50, v/v) adaptando os cartuchos OASIS HLB aos cartuchos de sílica (**Figura 12**) (Rocha et al. 2013).

Por fim, os extratos resultantes da eluição anterior foram evaporados até à secura num bloco de aquecimento a uma temperatura de 40 °C debaixo de uma fonte de N₂. Antes da análise por GC-MS, estes extratos foram reconstituídos com 250 µL de metanol anidro, e sujeitas a vórtex. As amostras acabaram assim com um fator de concentração de 4.000x.

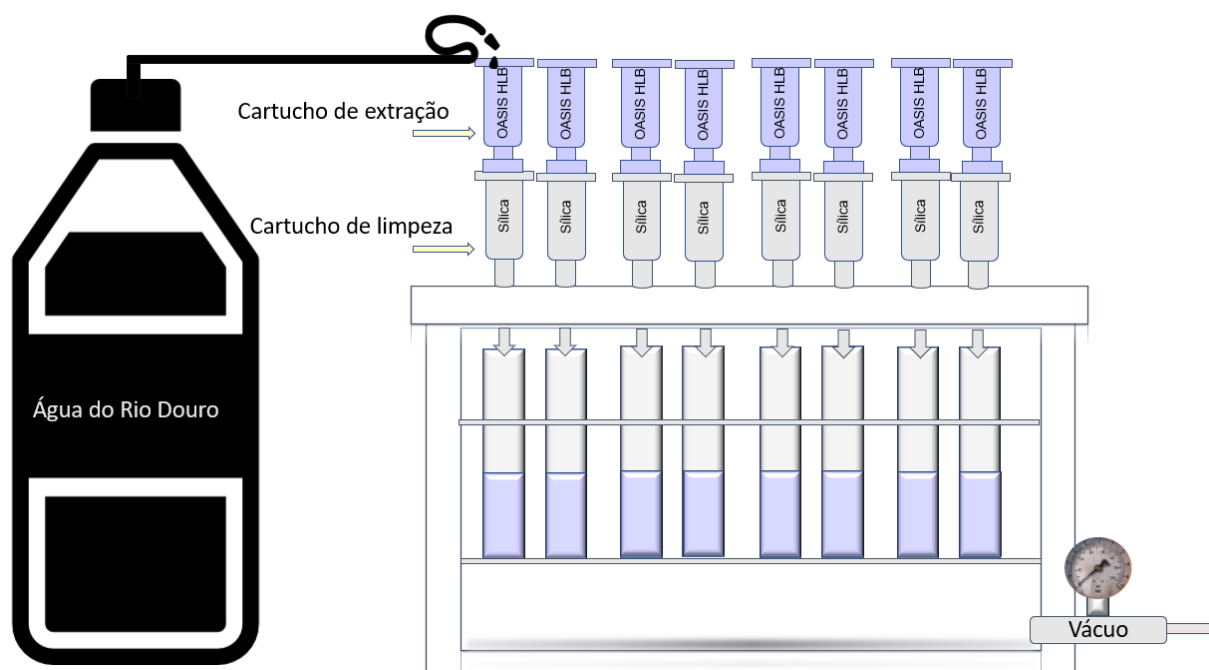


Figura 12. Esquema do sistema de extração usado para a limpeza e concentração de EDCs a partir de amostras de água.

5. Quantificação por GC-MS

Devido à pouca volatilidade da maioria dos EDCs estudados, a sua derivatização foi essencial (Rocha et al. 2013). No processo de derivatização, 50 µL de cada extrato foi evaporado sob uma suave fonte de N₂ e adicionado de 50 µL de piridina + 50 µL de BSTFA (1% TMCS). Depois, esta mistura foi aquecida a 70 °C durante 30 min e os derivados-TMS foram evaporados e reconstituídos com 100 µL de hexano (Rocha et al. 2013) antes da sua análise por GC-MS.

O cromatógrafo a gás (Trace GC ultra, Thermo Finnigan Eletron Corporation) encontrava-se acoplado a um espectrómetro de massas (Thermo Scientific ITQ™ 1100 GC-MSⁿ), um autosampler (Thermo Scientific TriPlus™) e a uma coluna capilar TR5MS (30 m × 0,25 mm i.d., 0,25 µm espessura).

O gás de transporte foi Hélio (99.9999% puro), mantido a uma corrente constante de 1 mL/min.

A temperatura do forno foi programada como se segue:

(a) Desde 100 °C (tempo de equilíbrio de 1 min) até 200°C com um aumento de 10 °C/min;

(b) Desde 200 °C até 260 °C a 6 °C/min;

(c) Desde 260 °C até 290 °C a 1 °C/min;

(d) A 290 °C por 5 min.

A linha de transferência e a fonte de iões para o espectro de massas foi de 280 °C. As amostras foram injetadas (3 µL) com uma agulha de injeção de 80 mm (em modo *splitless*).

A análise quantitativa foi realizada por calibração externa usando o modo de monitorização de iões (*Selected Ion Monitoring*, SIM).

Como os EDCs foram medidos em ng/L, foram usados brancos para que não ocorressem contaminações das amostras. Além disto, ainda foram usadas amostras de água incluindo todos os EDCs estudados com uma concentração média de 150 µg/L para garantir uma qualidade contínua dos resultados.

6. Atividade estrogénica e avaliação de risco

O potencial estrogénico de todos os EDCs estudados foi calculado neste estudo considerando a sua potência relativamente à do E_2 .

Os resultados foram expressos em equivalentes de E_2 (E_2 -EQ). O fator (F) equivalente de E_2 foi obtido através de ensaios *in vitro* (Coldham et al., 1997; Beck et al. 2006). Os valores de E_2 -EQ foram calculados pela fórmula matemática:

$$E_2\text{-EQ} = \text{Concentração ambiental de um EDC específico} \times F$$

O potencial risco ecotoxicológico para os organismos aquáticos quando expostos a contaminantes dos EDCs foi calculado baseado no quociente de perigo (*Hazard Quotient*, HQ), pela fórmula matemática:

$$HQ = MEC/PNEC$$

MEC significa (*Measured Environmental Concentration*) ou seja, HQ é o quociente entre a concentração de cada poluente medida no ambiente e o PNEC (*Predicted No-Effect Concentration*) é a concentração de cada agente tóxico que não promove efeitos adversos aos organismos.

Segundo estudos prévios, o PNEC para estradiol é de 2 ng/L (Caldwell et al., 2012). Neste estudo, quando os compostos em análise não apresentaram valores de PNEC conhecidos, foram utilizados os valores de E_2 -EQ, como se fossem de E_2 para calcular o valor de HQ .

De acordo com Wentsel et al. (1996), foi considerada a seguinte escala para a classificação dos resultados provenientes de HQ :

$HQ < 1,0$, sem risco significativo;

$1,0 \leq HQ < 10$, pouco potencial para efeitos adversos;

$10 \leq HQ < 100$, risco considerável para efeitos adversos;

$HQ \geq 100$, devem ser esperados potenciais efeitos adversos (Wentsell et al., 1996).

7. Análise estatística

A estatística descritiva e inferencial foi realizada pelos *softwares* PAST 4.02 (Hammer et al. 2001) e GraphPad Prism (6.01, GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA).

Os testes Shapiro-Wilk W e Levine verificaram respetivamente a normalidade e a homogeneidade de variâncias.

As comparações entre sítios independentes e os grupos de compostos foram investigadas através da análise de variância unidirecional (ANOVA).

O teste de Tukey avaliou as comparações *post-hoc*. Sempre que os pressupostos paramétricos e a transformação de dados falharam, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste *post-hoc* de Dunn. O nível limiar significativo de α foi o padronizado 0,05.

Quando as concentrações dos EDC estavam abaixo dos limites de deteção (LOD) do método GC-MS, estes resultados foram tratados como proposto pela USEPA (2006), ou seja, valor = $LOD/(\sqrt{2})$.

Capítulo 3. Resultados

1. Estrogénios

Os estrogénios mostraram índices de deteção (DR) de 98,3 %. Em média, as concentrações anuais de E₁, E₂ e EE₂ foram de 3,4 ng/L, 8,5 ng/L e 3,2 ng/L, respetivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Concentrações dos estrogénios medidos no estuário do Rio Douro durante 2019. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (SD).

EDCs	Inverno (n = 10, ng/L)	Primavera (n = 10, ng/L)	Verão (n = 10, ng/L)	Outono (n = 10, ng/L)	Média da Concentração anual (n = 40, ng/L)
E ₁	3,0 $\pm$ 1,1	3,1 $\pm$ 1,9	3,6 $\pm$ 2,1	3,7 $\pm$ 1,7	3,4 $\pm$ 1,7
E ₂	6,1 $\pm$ 5,6	7,0 $\pm$ 5,2	11,5 $\pm$ 7,0	9,3 $\pm$ 5,7	8,5 $\pm$ 6,1
EE ₂	2,9 $\pm$ 1,4	2,2 $\pm$ 0,8	4,0 $\pm$ 3	3,8 $\pm$ 2,2	3,2 $\pm$ 2,1

A **Figura 13** mostra que as concentrações de E₂ são superiores às de E₁ e EE₂ ($p < 0,05$).

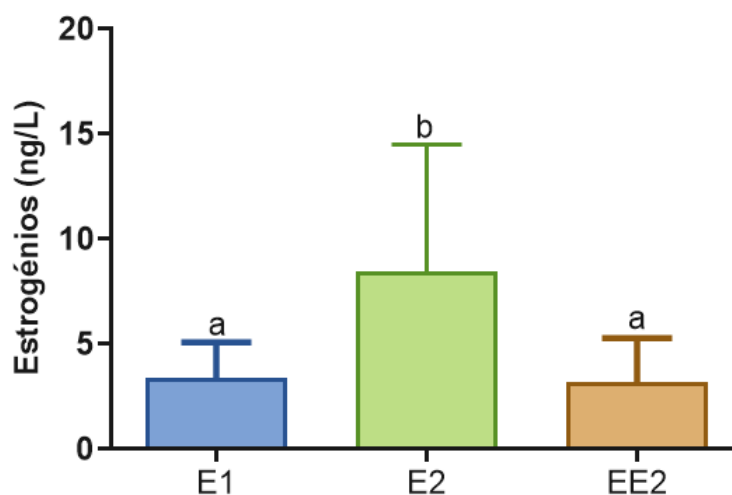


Figura 13. Níveis globais médios (ng/L) de estrogénios no estuário do Rio Douro (n = 40). Os resultados são expressos em média $\pm$ SD. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as concentrações de E₁, E₂ e EE₂ ($p < 0,05$).

Além disso, a **Figura 14** mostra que não existem diferenças entre os locais de amostragem.

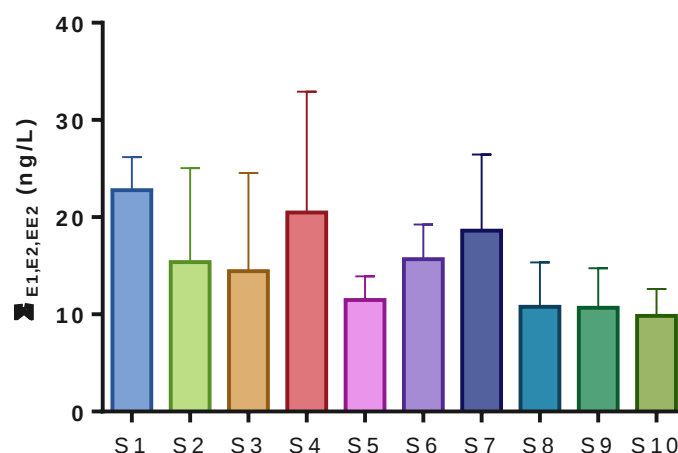


Figura 14. Níveis médios (ng/L) de estrogénios por local de amostragem (n = 16). Os resultados são expressos média $\pm$ SD.

A **Tabela 4** revela que os estrogénios são os EDCs que mais contribuem para a carga estrogénica neste estuário, cujo valor de E_2 -EQ atinge 13,7 ng/L. Esta tabela também mostra que EE₂ é o estrogénio que mais contribui para o índice HQ que só para este composto é de 32.

Tabela 4. Avaliação de risco ecológico de estrogénios no estuário do Rio Douro. As concentrações aqui referidas são as concentrações ambientais médias (MECs) medidas nas águas superficiais recolhidas deste habitat.

EDCs	Média da Concentração anual (n = 40, ng/L)	Potência relativa a E ₂	E ₂ -EQs (ng/L)	PNEC (ng/L)	HQs	Referências (PNECs)
E ₁	3,4	3,0E-01	1,0E+00	6,0	0,6	Caldwell et al. 2012
E ₂	8,5	1,0E+00	8,5E+00	2,0	4,2	Caldwell et al. 2012
EE ₂	3,2	1,3E+00	4,2E+00	0,1	32,3	Caldwell et al. 2012
Totais (Σ)			13,7		37	

2. Fitoestrogénios e sitosterol

Os fitoestrogénios e o SITO foram medidos em 100% das amostras de águas superficiais. As concentrações médias de BIO-A, DAID, FORM, GEN e SITO foram respetivamente 827 ng/L, 3,6 ng/L, 12,5 ng/L, 7,8 ng/L e 132,7 ng/L (**Tabela 5**), e não foram detetadas diferenças entre as épocas de amostragem.

Tabela 5. Concentrações dos fitoestrogénios e SITO medidos no estuário do Rio Douro durante 2019. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (SD).

EDCs	Inverno (n= 10, ng/L)	Primavera (n = 10, ng/L)	Verão (n = 10, ng/L)	Outono (n = 10, ng/L)	Média da Concentração anual (n= 40, ng/L)
BIO-A	881 $\pm$ 951	711 $\pm$ 517	946 $\pm$ 777	770 $\pm$ 558	827 $\pm$ 657
DAID	3,9 $\pm$ 2,8	4,5 $\pm$ 3,3	2,6 $\pm$ 1,8	3,2 $\pm$ 3,1	3,6 $\pm$ 2,8
FORM	12,2 $\pm$ 5,1	11,4 $\pm$ 3,0	13,5 $\pm$ 7,3	12,9 $\pm$ 8,8	12,5 $\pm$ 6,2
GEN	9,1 $\pm$ 5,5	8,3 $\pm$ 6,7	4,4 $\pm$ 2,7	9,3 $\pm$ 12,6	7,8 $\pm$ 7,8
SITO	118 $\pm$ 69,7	153 $\pm$ 78,4	105 $\pm$ 94,7	156 $\pm$ 180	133 $\pm$ 112

A **Figura 15** mostra que as concentrações médias anuais de BIO-A > SITO > FORM > GEN > DAID ($p < 0,05$).

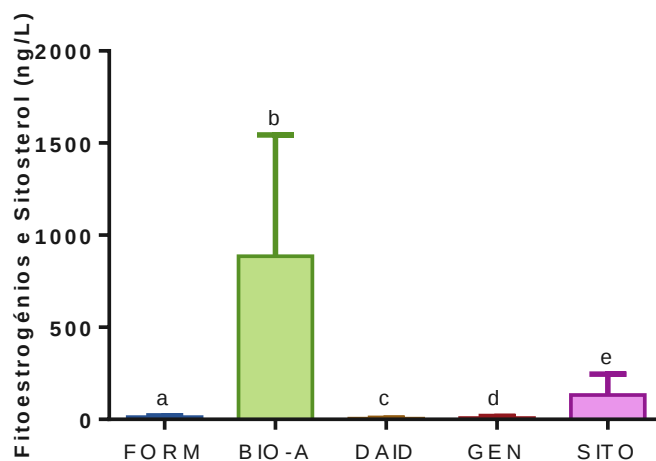


Figura 15. Níveis globais médios (ng/L) de fitoestrogénios (n = 40) e SITO (n = 40). Os resultados são expressos em média $\pm$ SD. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre concentrações de FORM, BIO-A, DAID, GEN e SITO ($p < 0,05$).

A **Figura 16** revela diferenças entre vários locais de amostragem. Em última análise, o ponto de colheita S₃ representa uma das áreas com maiores quantidades destes EDCs ($p < 0,05$).

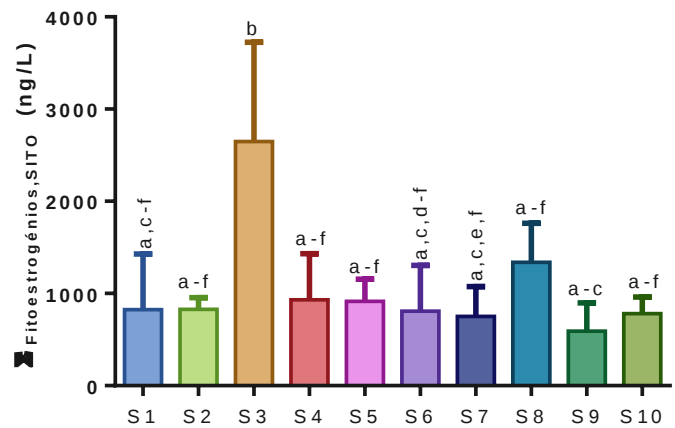


Figura 16. Níveis médios (ng/L) de fitoestrogénios por local de amostragem ($n = 16$). Os resultados são expressos em média $\pm$ SD. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os locais de amostragem ($p < 0,05$).

A **Tabela 6** revela que o BIO-A é o fitoestrogénio que mais contribui para a carga estrogénica neste estuário, mostrando um E_2 -EQ de 7,5 ng/L. No total, a carga estrogénica resultante da presença destes EDCs é de 8,0 ng/L. Esta tabela também indica que o BIO-A é o fitoestrogénio que mais contribui para o $HQ = 3,8$ colocada por estes compostos, que no seu conjunto apresentam um $HQ = 4$.

Tabela 6. Avaliação de risco ecológico de fitoestrogénios e SITO no estuário do Rio Douro. As concentrações aqui referidas são as concentrações ambientais médias (MECs) medidas nas águas superficiais coletadas deste habitat; *n.a.* – não aplicável.

EDCs	Média da Concentração anual ($n = 40$, ng/L)	Potência relativa a E_2	E_2 -EQs (ng/L)	PNEC (ng/L)	HQs	Referências (PNECs)
BIO-A	827	9,10E-03	7,5E+00	-	3,8	-
DAID	3,6	1,30E-03	4,6E-03	-	0,0	-
FORM	12,5	5,60E-03	7,0E-02	-	0,0	-
GEN	7,8	4,90E-02	3,8E-01	-	0,2	-
SITO	133	<i>n.a.</i>	-	-	-	-
Totais (Σ)			8,0		4,0	

3. Compostos industriais

BPA esteve presente em 100% das amostras de água e apresentou uma concentração global de 48,3 ng/L. Não foram encontradas diferenças para a BPA entre locais e épocas de amostragem.

Relativamente aos OPs, com exceção do 4-t-OP (55%), todos os outros compostos foram quantificados em 100% de todas as amostras. Aqui, as concentrações globais de 4-n-OP, 4-t-OP, OP₁EO e OP₂EO foram de 2,0 ng/L, 16,6 ng/L, 96,8 ng/L, e 983 ng/L (**Tabela 7**), e não foram encontradas diferenças entre as épocas de amostragem.

Tabela 7. Concentrações dos xenoestrogénios de origem industrial medidos no estuário do Rio Douro durante 2018-2019. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (SD).

EDCs	Inverno (n = 10, ng/L)		Primavera (n = 10, ng/L)		Verão (n = 10, ng/L ng/L)		Outono (n = 10, ng/L)		Média da Concentração anual (n = 40, ng/L)
BPA	53,9	± 44	55,1	± 41,2	45,5	± 35	38,5	± 28,3	48,3 ± 36,8
4-n-OP	1,8	± 1,2	1,6	± 0,7	2,3	± 1,7	2,1	± 2,1	2,0 ± 1,5
4-t-OP	19,7	± 27,6	12,7	± 6,9	15,8	± 19,8	18,2	± 29	16,6 ± 21,9
OP ₁ EO	95,7	± 55,5	86	± 34	135	± 121	70,2	± 44,8	96,8 ± 73,5
OP ₂ EO	965	± 816	1093	± 1070	1104	± 495	770	± 421	983 ± 731
4-NP	802	± 594	826	± 721	830	± 544	575	± 346	758 ± 556
4-n-NP	25,5	± 11,2	20,7	± 8,7	30,3	± 18,9	19,1	± 12,7	23,9 ± 13,6
NP ₁ EO	538	± 704	449	± 598	551	± 612	392	± 320	483 ± 558
NP ₂ EO	2501	± 1878	1963	± 1757	4220	± 4344	2067	± 1728	2688 ± 2723

A **Figura 17** mostra as diferenças entre as concentrações destes EDCs, ou seja, OP₂EO > OP₁EO > 4-t-OP > 4-n-OP (p < 0,05).

Relativamente aos NPs, estes foram medidos em 100% das amostragens. Aqui, as concentrações médias de 4-NP, 4-n-NP, NP₁EO e NP₂EO foram 758 ng/L, 23,9 ng/L, 483 ng/L e 2688 ng/L (**Tabela 7**), respetivamente, e não foram encontradas diferenças entre as épocas de amostragem.

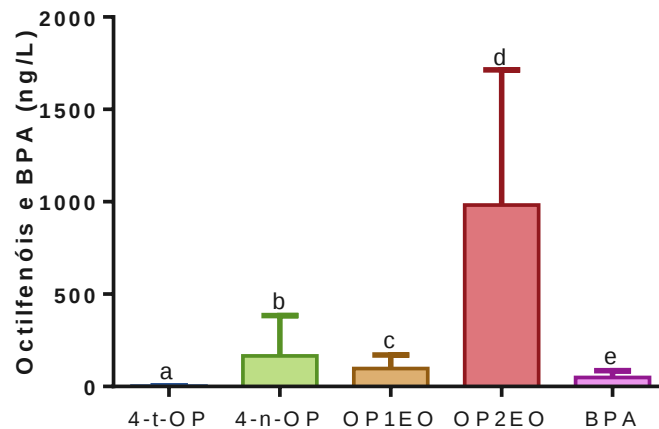


Figura 17. Níveis globais médios (ng/L) de octilfenóis e BPA. Os resultados são expressos em média $\pm$ SD. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre concentrações de 4-t-OP, 4-n-OP, OP₁EO, OP₂EO e BPA ($p < 0,05$).

A **Figura 18** mostra as diferenças entre os locais de amostragem sendo os mais óbvios medidos na margem sul do estuário, onde em geral foram medidas quantidades mais elevadas destes EDCs.

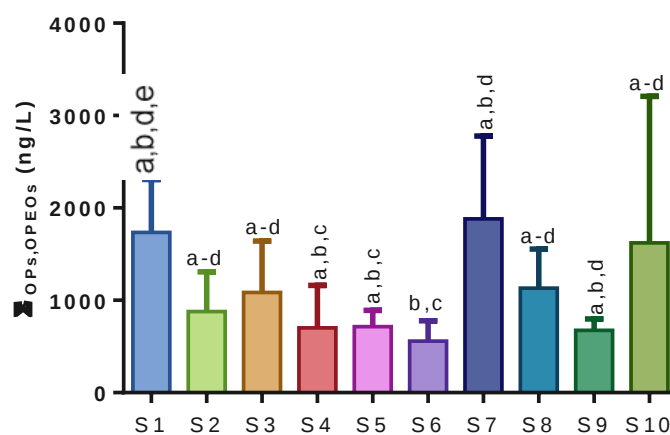


Figura 18. Níveis médios (ng/L) de octilfenóis por local de amostragem ($n = 16$). Os resultados são expressos em média $\pm$ SD. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os locais de amostragem ($p < 0,05$).

A **Figura 19** demonstra diferenças significativas entre as concentrações dos últimos EDCs referidos, ou seja, NP₂EO > NP₁EO > 4-n-NP > 4-NP ($p < 0,05$).

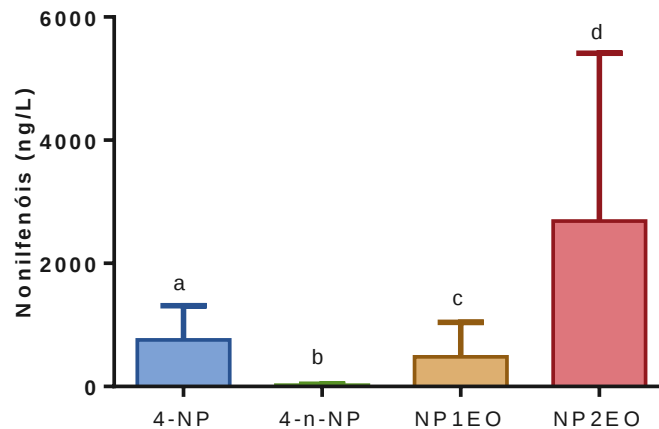


Figura 19. Níveis globais (ng/L) de nonilfenóis (n = 40). Os resultados são expressos em média $\pm$ SD. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre concentrações de 4-NP, 4-n-NP, NP₁EO e NP₂EO ($p < 0,05$).

A **Figura 20** mostra as diferenças entre os locais de amostragem sendo os mais óbvios medidos em S₁ e na margem sul do estuário (S₇-S₉), onde em geral foram medidas quantidades mais elevadas destes EDCs.

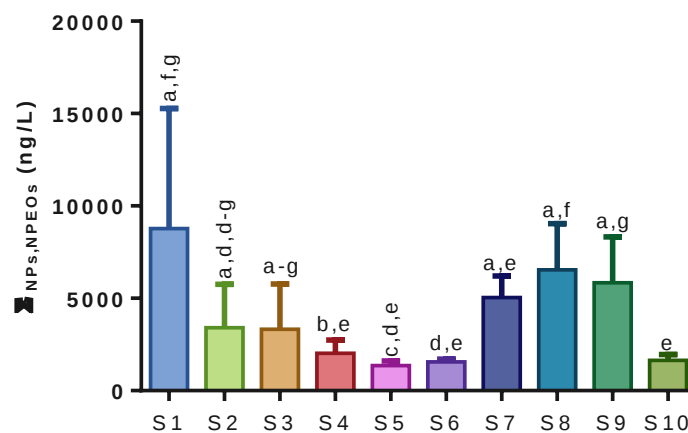


Figura 20. Níveis médios (ng/L) de nonilfenóis por local de amostragem (n = 16). Os resultados são expressos em média $\pm$ SD. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os locais de amostragem ($p < 0,05$).

A **Tabela 8** revela que 4-NP é o composto industrial que mais contribui para a carga estrogénica deste estuário, mostrando um E_2 -EQ de 3,0 ng/L. Esta tabela também indica que o NP₂EO é o poluente que mais contribui para o $HQ = 11,3$.

Tabela 8. Avaliação de risco ecológico de estrogénios no estuário do Rio Douro. As concentrações aqui referidas são as concentrações ambientais médias (MECs) medidas nas águas superficiais coletadas deste habitat.

EDCs	Média da Concentração anual (n = 40, ng/L)	Potência relativa a E ₂	E ₂ - EQs (ng/L)	PNEC (ng/L)	HQs	Referências (PNECs)
BPA	48,3	1,0E-04	4,8E-03	60,0	0,8	Wright-Walters et al., 2011
4-n-OP	2,0	4,0E-04	7,8E-04	13,0	0,2	www.defra.gov.uk
4-t-OP	16,6	1,3E-05	2,2E-04	61,2	0,3	Yang 2019
OP ₁ EO	96,8	5,0E-06	4,8E-04	-	0,0	-
OP ₂ EO	983	5,0E-06	4,9E-03	-	0,0	-
4-NP	758	4,0E-03	3,0E+00	508	1,5	Yang 2019
4-n-NP	23,9	5,0E-05	1,2E-03	508	0,0	Yang 2019
NP ₁ EO	483	6,3E-07	3,0E-04	-	0,0	-
NP ₂ EO	2688	6,3E-07	1,7E-03	238	11,3	Yang 2019
Totais (Σ)			3,0		14,1	

4. Resultados físico-químicos

A temperatura das águas variou entre 11,9 °C no inverno a 22,3 °C no verão. A salinidade variou entre ≈ 9 PSU (S₁ a S₈) e 1,8 em S₆. O pH (7,5) foi quase constante durante todo o ano.

Os níveis médios anuais dos outros parâmetros são os seguintes: NO₃⁻ = 1,5 mg/L, NO₂⁻ = 0,05 mg/L, NH₄⁺ = 1,9 mg/L, NH₃ = 0,024 mg/L e PO₄³⁻ = 0,14 mg/L (**Figura 21**).

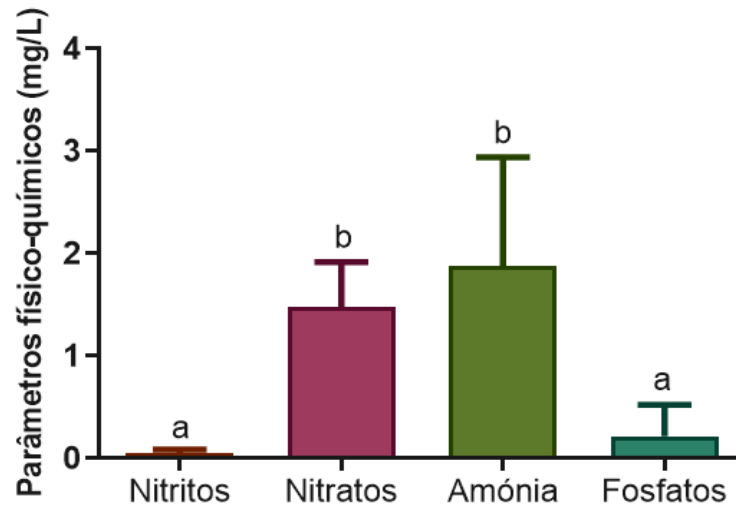


Figura 21. Dados físico-químicos avaliados localmente no estuário do rio Douro durante 2018-2019 (n = 40). Os resultados são expressos em média $\pm$ SD. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as concentrações dos nitritos, nitratos, amónia e fosfatos ($p < 0,05$).

A **Figura 22** revela que S₄ é o local de amostragem com as quantidades mais elevadas dos últimos compostos.

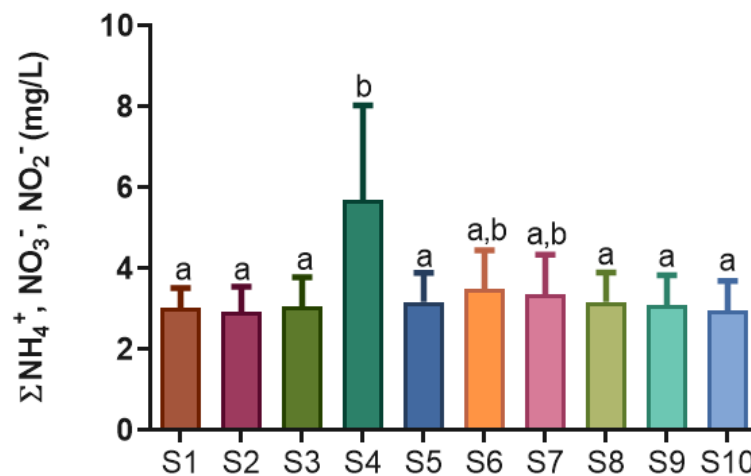


Figura 22. Somatório das concentrações médias de nitritos, nitratos e amónia por local de amostragem (n = 16). Os resultados são expressos em média $\pm$ SD. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os locais de amostragem ($p < 0,05$).

Capítulo 4. Discussão

1. Estrogénios

Nos peixes e em outros animais aquáticos, os estrogénios produzem desregulações hormonais mesmo em concentrações tão baixas como alguns ng/L de E_2 (Mills and Chichester 2005; Nazari and Suja 2016).

No entanto, vários ambientes aquáticos portugueses e mundiais apresentam quantidades consideráveis de E_1 , E_2 e EE_2 (Rocha and Rocha 2015).

O estuário do rio Douro foi uma das áreas onde estes EDCs atingiram concentrações consideradas capazes de induzir perturbações endócrinas em peixes, ou seja, E_1 , E_2 e EE_2 foram respetivamente 2,9 ng/L, 7,0 ng/L e 4,5 ng/L (Rocha et al., 2013). De facto, nessa ocasião foi demonstrado que tainhas (*Mugil cephalus*) capturadas no estuário do Rio Douro na mesma ocasião dos últimos resultados apresentaram uma elevada percentagem de intersexo (*ovotestis*) (Carrola et al., 2012).

Uma vez que estes EDCs são considerados altamente prejudiciais para os organismos aquáticos, os estrogénios encontram-se atualmente no regulamento da lista de vigilância da UE (UE-Directive 2013), e, por conseguinte, os seus níveis ambientais não devem ser negligenciados.

Neste estudo, infelizmente verificou-se que as concentrações de E_1 , E_2 e EE_2 , respetivamente 3,3 ng/L, 8,5 ng/L e 3,2 ng/L, são semelhantes às medidas em 2010. Por esse motivo, conclui-se que desde 2010 não se registaram melhorias nas ETARs locais. Esta hipótese é apoiada tanto pela semelhança entre as concentrações como pelas suas respetivas proporções, ou seja, $E_2 > E_1 = EE_2$ (**Figura 13**). Além disto, a ausência de tendências sazonais para estes EDCs confirmou a sua omnipresença neste estuário (**Figura 14**).

Considerando que os PNECs, para exposições a longo prazo de estrogénios, são 6 ng/L para E_1 , 2 ng/L para E_2 e, e 0,1 ng/L para EE_2 (Caldwell, Mastrocco et al. 2012), observa-se que os valores médios determinados neste estuário para E_2 e EE_2 ultrapassam claramente estes níveis. Como as concentrações de E_1 e EE_2 foram transformadas

em E_2 -EQ e se obteve o resultado de 14 ng/L concluímos que as concentrações ambientais destes EDCs (**Tabela 4**) atingem valores que são considerados capazes de produzir danos fisiológicos em organismos aquáticos (Mills and Chichester 2005; Nazari and Suja 2016). Esta hipótese é apoiada uma vez que o valor HQ calculado para os estrogénios (**Tabela 4**) atingiu o número 32, o que significa um potencial significativo de efeitos adversos em organismos aquáticos (Wentzel et al., 1996), o que sem dúvida tem confirmação os estudos feitos anteriormente neste estuário (Carrola et al., 2012; Rocha et al., 2013).

Comparando os resultados atuais (**Tabela 3**) com outros a nível mundial, as concentrações de estrogénios medidas neste estuário são superiores à maioria reportadas em outros rios europeus (Rocha and Rocha 2015; Pironti et al., 2021). Portanto, no que diz respeito aos estrogénios, a aplicação da DQA está a falhar nesta área (UE-Directive 2013).

2. Fitoestrogénios e sitosterol

Os fitoestrogénios e o SITO são compostos naturais feitos por plantas estruturalmente e/ou funcionalmente semelhantes aos estrogénios de mamíferos ou aos seus metabolitos ativos (Benassayag et al., 2002). Entre eles, as isoflavonas BIO-A, GEN, FORM e DAID, mostram afinidade com os recetores estrogénicos (Benassayag et al., 2002). Apesar de serem menos ativos que o E_2 , podem exercer uma ação semelhante a essa hormona quando as suas concentrações se encontram dentro da gama $\mu\text{g/L}$ (Hoerger et al., 2009), o que se verificou suceder em vários ambientes aquáticos portugueses, incluindo o estuário do rio Douro (Rocha and Rocha 2015). A presença de BIO-A e FORM neste habitat foi relacionado com abundância de trevo vermelho (*Trifolium pratense* L., Fabaceae) e papilionáceas (Papilionaceae) nas margens do rio (Ribeiro et al., 2009). Também, DAID e GEN, caracterizadas como componentes essenciais de frutas, cereais e vegetais, foram relacionadas com a existência de muitas explorações agrícolas em todo o rio Douro (Rocha et al., 2013; Rocha and Rocha 2015).

Neste estudo, apesar das suas elevadas quantidades deste tipo de compostos (**Figura 15, Tabela 5**) não foram encontradas tendências sazonais, além de que as concentrações de BIO-A, GEN e DAID diminuíram 5 a 6 vezes, FORM 14 vezes e SITO 8 vezes em comparação com as medidas no passado (Rocha et al., 2013). Assim, atual-

mente, a fonte dos fitoestrogénios e do SITO nas águas do estuário do Rio Douro torna-se menos evidente.

Relativamente ao SITO, sabe-se que este fitoesterol é estruturalmente semelhante ao colesterol (Benassayag et al., 2002), pelo que existindo em concentrações elevadas também promove disrupção endócrina. O SITO, foi identificado como um componente essencial das plantas vasculares, é conhecido por diminuir a disponibilidade do colesterol para P450scc (uma enzima envolvida na conversão dessa hormona em pregnenolona) ou por reduzir a atividade dessa enzima (Santos et al. 2008; Volkman et al., 2008).

A **Tabela 6** mostra que o E_2 -EQ dos fitoestrogénios avaliados é em média 8 ng/L e tem um HQ de 4. Os últimos resultados mostram que apesar de se ter registado uma diminuição das concentrações de fitoestrogénios neste habitat, estes compostos podem, por si só, causar disrupção endócrina estrogénica em organismos aquáticos (Mills and Chichester 2005; Nazari and Suja 2016).

3. Compostos industriais

BPA é libertada no ambiente aquático através da degradação natural dos plásticos (Crain et al., 2007), lixiviados de plásticos degradados (Wintgens et al., 2003) ou mesmo através de esgotos, após a ingestão humana de alimentos contaminados (Meesters e Schröder 2002). Recentemente, foram medidas quantidades elevadas de microplásticos no estuário do rio Douro (Rodrigues et al., 2019). Assim, a presença de BPA, em quantidades (48 ng/L) semelhantes às medidas anteriormente neste habitat (43 ng/L) (Rocha et al., 2013), confirma a presença ubíqua deste EDC neste estuário.

Os APEOs podem promover efeitos estrogénicos inesperados na fauna selvagem e nos seres humanos e, embora as APEOs tenham sido banidos da Europa desde 2003 (Directive 2003/53/CE; CE 2016/26), estão presentes no estuário do Rio Douro, pelo menos desde 2009 (Rocha et al., 2011).

Uma vez que as legislações da UE e Portuguesa consideram estes EDCs compostos não autorizados, a sua presença atual neste ambiente não é totalmente compreendida (UE-Directive 2013; DR 2015). Uma das fontes mais prováveis destes APEOs pode ser a utilização de materiais importados, incluindo matérias-primas, uma vez que

existem muitas indústrias (incluindo têxteis) nesta região (Pinto et al., 2010), que podem utilizar este tipo de compostos inadvertidamente. Também é possível que os APEOs tenham origem em várias misturas de pesticidas, uma vez que estes agentes tensoativos ajudam à sua dispersão, podendo então estes chegar ao estuário por lixiviação (Cruzeiro et al., 2017). Finalmente, as descargas urbanas promovidas associadas a ETARs não eficientes não podem ser descartadas (Rocha e Rocha 2015).

Além disso, como os APEOs quando se degradam, originam OPs e NPs, que são muito mais prejudiciais e persistentes do que os compostos etoxilados (Priac et al., 2017). A **Figura 17** mostra precisamente esse fenómeno, uma vez que as concentrações de OP₂EO e NP₂EO são mais elevadas do que as de OP e NPs.

Assim este estudo mostrou um aumento das concentrações de APEOs, e APs medidas neste estuário em comparação com resultados anteriores (Rocha et al., 2012; Rocha et al., 2013). Assim, em média, as concentrações de 4-n-OP, OP₁EO e OP₂EO são, respetivamente, 7, 2 e 4 vezes superiores às determinadas em estudos anteriores (Rocha et al., 2013). Também, os níveis atuais de 4-NP, NP₁EO e NP₂EO são 6, 13 e 40 vezes mais elevados do que os reportados no passado (Rocha et al., 2013). Como as concentrações de OPs e NPs são, respetivamente, sistematicamente superiores a 10 ng/L e 300 ng/L, que são os valores máximos de referência estipulados quer pela regulamentação europeia como nacional (Directive 2013; DR 2015), concluímos que também no que diz respeito a estes compostos existe um desrespeito relativo à legislação.

A **Figura 18** mostra que as áreas onde existem APs em quantidades mais elevadas estão localizadas em S₁ (margem norte) e de S₇ a S₁₀ (margem sul). Sugere-se que S₁, localizado na foz do estuário, pode concentrar todos os poluentes que vêm de montante, uma vez que a presença dos quebra-mares nesta área impede o contacto imediato entre as águas do estuário e o Oceano Atlântico. Por outro lado, o local de amostragem S₇ recebe águas de um afluente do rio Douro (o rio Febros) e do efluente da ETAR Febros, que, juntamente com os tratamentos locais inadequados de esgotos, contribuem para a poluição desta área. A este respeito, em 2008, a análise histopatológica de góbios (*Gobio gobio*) e tainhas (*M. cephalus*) revelou diferenças significativas entre os animais apanhados a montante e a jusante de S₇, relacionadas com o declínio da qualidade da água nesta área (Pinto et al., 2010).

Como o estudo anterior ocorreu em paralelo com o nosso último levantamento no rio Douro (Rocha et al., 2013), concluímos que desde então não parece ter havido qualquer melhoria na qualidade da água.

Considerando o potencial desregulador endócrino destes compostos, a **Tabela 2** mostra que os EDCs industriais por si só contribuem com 3 ng/L de E_2 -EQ e apresentam um *HQ* de 13. Estes resultados estão em concordância com a ocorrência de potenciais efeitos adversos para a biota local (Wentzel et al., 1996) incluindo as perturbações endócrinas observadas anteriormente (Pinto et al., 2010), pelo que será possível antever que a fauna local continua a apresentar danos fisiológicos semelhantes aos descritos no passado e referidos acima.

Outra observação sobre estes EDCs industriais é que as suas concentrações são contínuas ao longo de todo o ano. Além disto, comparações entre os resultados atuais e outros a nível mundial levaram à conclusão de que as concentrações destes poluentes industriais continuam a ser extremamente elevadas no Rio Douro, apesar da sua presença continuar a ser observada em outros países da UE (Rocha e Rocha 2015; Priac et al., 2017).

4. Parâmetros físico-químicos

Vários parâmetros físico-químicos estreitamente relacionados com descargas de esgotos e ETAR (pH, amónio, nitritos, nitratos e fosfatos) foram avaliados para este estuário (**Figura 21**). Uma vez que os níveis destes parâmetros se encontravam dentro dos mesmos intervalos reportados anteriormente para este estuário, também estes resultados corroboram que este ambiente aquático não foi melhorado durante a última década (Rocha et al., 2013).

A **Figura 22** mostra que as áreas onde os níveis de amónia, nitratos e nitritos são mais elevados são encontrados perto de ETARs. No entanto, outras fontes destes compostos parecem existir regularmente neste estuário. De facto, têm sido relatadas descargas diretas de urina/fezes humanas de barcos turísticos (<https://agriculturaemar.com/quercus-descargas-ilegais-de-esgotos-de-embarcacoes-turisticas-provocam-danos->

ambientais-no-douro/). No entanto, estas fontes necessitam ser devidamente investigadas de modo a se evitarem conclusões precipitadas.

Relativamente às quantidades de fosfatos, estas apresentam concentrações médias anuais de 0,14 mg/L, com um máximo, no verão, de 0,5 mg/L em S₄; valor bem acima do máximo aceitável de 0,1 mg/L para evitar a eutrofização (<https://water-research.net/index.php/phosphates>). Apesar disto, as quantidades médias anuais de fosfatos são compatíveis com a legislação nacional (DR 2017).

Conclusões

Este estudo mostra a presença de EDCs naturais, farmacêuticos e industriais em níveis que permitem o desenvolvimento de doenças endócrinas em animais aquáticos, particularmente em peixes.

O cálculo dos E_2 -EQs mostra que este estuário possui o equivalente a 25 ng/L de E_2 , o que é um valor extremamente elevado. Além disso, o cálculo da $HQ = 54$ confirma que a vida aquática está em perigo neste estuário.

A presença de nitratos, nitritos e fosfatos neste estuário em concentrações que podem induzir danos nos organismos locais demonstra que as atuais ETARs não estão a ser eficientes na remoção de produtos químicos nocivos, representando um risco para o habitat local e também para os seres humanos, principalmente no verão, ocasião em que as praias fluviais nesta zona são amplamente usadas.

As áreas que se destacaram como mais poluídas foram nas margens norte e sul junto aos efluentes da ETARs de Freixo (S₄) e de Febros (S₇). No entanto, todo o estuário se encontra comprometido já que as diferenças entre os locais e ocasiões do ano foram escassas.

Como os habitantes do Grande Porto utilizam amplamente várias praias fluviais nesta área para atividades de natação e pesca, a presença destes compostos, juntamente com todos os EDCs acima referidos, pode constituir um problema de saúde humana que as autoridades locais deverão ter consideração.

Referências bibliográficas

- Aris, A.Z., Shamsuddin, A.S., Praveena, S.M. (2014) Occurrence of 17 α -ethinylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: Review. *Environment International* 69: 104–119.
- Beck, I.-C., Bruhn, R. and Gandrass, J. (2006) Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen. *Chemosphere* 63(11): 1870-1878.
- Benassayag, C., Perrot-Applanat, M. and Ferre, F. (2002) Phytoestrogens as modulators of steroid action in target cells. *Journal of Chromatography B* 777(1): 233-248.
- Bettencourt, P., Silva, N. and Alcobia, S. (2009) Environmental impact assessment of the Douro jetties: a success case. 29th Annual Conference of the International Association for Impact Assessment. Accra International Conference Center, Ghana.
- Caldwell, D.J., Mastrocco, F., Anderson, P.D., Lange, R. and Sumpter, J.P. (2012) Predicted-no-effect concentrations for the steroid estrogens estrone, 17 β -estradiol, estriol, and 17 α -ethinylestradiol. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31(6): 1396-1406.
- Carrola, S.C., Fontainhas-Fernandes, A., Martinho, F., Rocha, M.J., Ferreira-Cardoso, J., Gouveia, A. and Rocha, E. (2012) Assessment of intersex severity in grey mullets from three Portuguese estuaries - Preliminary data. *Comparative Biochemistry and Physiology A. Molecular & Integrative Physiology* 163(1): S37-S37.
- Changa, H.-S., Chooa, K.-H., Leeb, B., and Choia, S.-J. (2009) The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. *Journal of Hazardous Materials* 172, 1–12.
- Colburn, T., Dumanoski, D., Myers, J.P. (1996) Our stolen future: are we threatening our fertility, intelligence, and survival? - A scientific detective story. in *Our stolen future: are we threatening our fertility, intelligence, and survival? - A scientific detective story*. ISBN-10: 0452274141. 336 pp.
- Coldham, N.G., Dave, M., Sivapathasundaram, S., McDonnell, D.P., Connor, C. and Sauer, M.J. (1997) Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay. *Environmental Health Perspectives* 105(7): 734-742.

Commission, E. (2001) Decision no 2455/2001/ec of the European Parliament and of the Council of 20 November 2001 establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC. Official Journal of the European Communities L 331.

Cos, P., De Bruyne, T., Apers, S., Berghe, D.V., Pieters, L., Vlietinck, A.J. (2003) Phytoestrogens: recent developments. *Planta Medica*, 69(7): 589-599.

Crain, D.A., Eriksen, M., Iguchi, T., Jobling, S., Laufer, H., LeBlanc, G.A. and Guillette, L.J. (2007). An ecological assessment of bisphenol-A: Evidence from comparative biology. *Reproductive Toxicology* 24(2): 225-239.

Cruzeiro, C., Amaral, S., Rocha, E. and Rocha, M.J. (2017) Determination of 54 pesticides in waters of the Iberian Douro River estuary and risk assessment of environmentally relevant mixtures using theoretical approaches and *Artemia salina* and *Daphnia magna* bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 145: 126-134.

DR (2015) Decreto-Lei n.º 218/2015 de 7 de outubro de 2015. Diário da República Portuguesa. Ministério do Ambiente. 8667-8685.

DR (2017) Decreto-Lei n.º 235/2017 de 7 de dezembro de 2017. Diário da República Portuguesa. Ministério do Ambiente. 6555-6576.

Directive 2003/53/EC (2003) Directive 2003/53/EC of the European Parliament and of the Council of 18 June 2003 amending for the 26th time Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (nonylphenol, nonylphenol ethoxylate and cement). Official Journal of the European Union L 178 0024 - 0027.

Directive (2013) Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy Text with EEA relevance. Official Journal of the European Union L 226 001-0017.

EC (2016/26) Commission regulation of 13 January 2016 amending Annex XVII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals (REACH) as regards nonylphenol ethoxylates. Official Journal of the European Union L/91.

Francis-Floyd, R., Watson, C., Petty, D. and Pouder, D. (2015) Ammonia in aquatic systems. Fisheries and Aquatic Sciences. U.S. Department of Agriculture, UF/IFAS Extension Service, University of Florida, IFAS, Florida A & M University Cooperative Extension Program, and Boards of County Commissioners Cooperating. Nick T. Place, dean for UF/IFAS Extension. 1-5.

Hammer Ø, Harper D. and Ryan, P. (2001) Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4:1-9.

Harborne, J.B. (2000) Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, 55(6): 481-504.

Hoerger, C.C., Wettstein, F.E., Hungerbühler, K. and Bucheli, T.D. (2009) Occurrence and origin of estrogenic isoflavones in Swiss river waters. *Environmental Science & Technology* 43(16): 6151-6157.

Lewis, R.J. (1990) *Carcinogenically active chemicals: A reference guide*. Publisher: Van Nostrand Reinhold Company, NY. ISBN 10: 0442318758.

Meesters, R.J.W. and Schröder, H.F. (2002) Simultaneous determination of 4-nonylphenol and bisphenol A in sewage sludge. *Analytical Chemistry* 74(14): 3566-3574.

Mills, L. and Chichester C. (2005) Review of Evidence: Are Endocrine-Disrupting Chemicals in the Aquatic Environment Impacting Fish Populations? *The Science of the Total Environment* 343: 1-34.

Moss, T., Bouleau, G., Albiac, J. and Slavíkova, L. (2020) The EU Water Framework Directive twenty years on: Introducing the special issue. *Water Alternatives* 13(3): 446-457.

Nazari, E. and Suja F. (2016) Effects of 17 β -estradiol (E2) on aqueous organisms and its treatment problem: A review. *Reviews on Environmental Health* 31(4): 465-491.

Ostlund, R.E. (2004) Phytosterols and cholesterol metabolism. *Current Opinion in Lipidology* 15: 37–41.

Pinto, A.L., Varandas, S., Coimbra, A.M., Carrola, J. and Fontaínhas-Fernandes A. (2010) Mullet and gudgeon liver histopathology and macroinvertebrate indexes and metrics upstream and downstream from a wastewater treatment plant (Febros River—Portugal). *Environmental Monitoring and Assessment* 169(1): 569-585.

Pironti, C., Ricciardi, M., Proto, A., Bianco, P.M., Montano, L. and Motta, O. (2021) Endocrine-disrupting compounds: An overview on their occurrence in the aquatic environment and human exposure. *Water* 13(10):1347.

Priac, A., Morin-Crini, N., Druart, C., Gavaille, S., Bradu, C., Lagarrigue, C., Torri, G., Winterton, P. and Crini, G. (2017) Alkylphenol and alkylphenol polyethoxylates in water and wastewater: A review of options for their elimination. *Arabian Journal of Chemistry* 10: S3749-S3773.

Ribeiro, C., Tiritan, M.E., Rocha, E. and Rocha, M.J. (2009) 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.

Rocha, M.J and Rocha E. (2015) Estrogenic compounds in estuarine and coastal water environments of the Iberian Western Atlantic coast and selected locations worldwide — relevancy, trends and challenges in view of the EU Water Framework Directive. *Toxicology Studies - Cells, Drugs and Environment*. A. Andreazza and G. Scola (Eds.), IntechOpen: 153-193.

Rocha, M.J., Cruzeiro, C., Ferreira, C. and Rocha, E. (2012) Occurrence of endocrine disruptor compounds in the estuary of the Iberian Douro River and nearby Porto Coast (NW Portugal). *Toxicological and Environmental Chemistry* 94(2): 252-261.

Rocha, M.J., Cruzeiro, C. and Rocha, E. (2013) Development and validation of a GC-MS method for the evaluation of 17 endocrine disruptor compounds, including phytoestrogens and sitosterol, in coastal waters - their spatial and seasonal levels in Porto costal region (Portugal). *Journal of Water and Health* 11(2): 281-296.

Rocha, M.J., Ribeiro, C. and Ribeiro, M. (2011) Development and optimization of a GC-MS method for the evaluation of oestrogens and persistent pollutants in river and seawater samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 91(12): 1191-1205.

Rodrigues, S.M., Almeida, C.M.R., Silva, D., Cunha, J., Antunes, C., Freitas, V. and Ramos S. (2019) Microplastic contamination in an urban estuary: Abundance and distribution of microplastics and fish larvae in the Douro estuary. *Science of The Total Environment* 659: 1071-1081.

Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty G.C., Waldock, M. and Sumpter, J. P. (1998) Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environmental Science and Technology*, 32(11): 1559 – 1565.

Safe, S.H. (2000) Endocrine disruptors and human health--is there a problem? An update. *Environmental Health Perspectives* 108: 487-493.

Santos, E., Carreira, R. and Knoppers, B. (2008) Sedimentary sterols as indicators of environmental conditions in Southeastern Guanabara Bay, Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*. 56: 97-113.

Stephanou, E. and Giger, W. (1982) Persistent organic chemicals in sewage effluents. 2. Quantitative determinations of nonylphenols and nonylphenol ethoxylates by glass capillary gas chromatography. *Environmental Science and Technology* 16: 800–805.

Staples, C.A., Dorn, P.B., Klecka, G.M., O'Block, S.T. and Harris, L.R., 1998. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol-A. *Chemosphere* 36(10): 2149-73.

Tsai, W.T. (2006). Human health risk on environmental exposure to bisphenol-A: a review. *Journal of Environmental Science and Health, Part C* 24(2): 225-255.

UE-Directive (2013) Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *Official Journal of the European Union* L 226: 1-17.

USEPA (2006) US Environmental Protection Agency. Data quality assessment: statistical methods for practitioners EPA QA/G9-S. Washington: The Agency; 2006. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/g9s-final.pdf>.

Volkman, J.K., Revill A.T., Holdsworth, D. and Fredericks D (2008) Organic matter sources in an enclosed coastal inlet assessed using lipid biomarkers and stable isotopes. *Organic Geochemistry* 39(6): 689-710.

Wei, H.-B., Lin, J.-M., Wu, D.-N. Zhao, L.-X., Li, Z.-J. and Ying X.-T. (2007) Detection of 17 β -estradiol in river water and human urine by highly sensitive chemiluminescence enzyme immunoassay. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 35(3), 320–324.

Wentzel, R.S., LaPoint, T. W., Simini, M., Checkail, R. T., Ludwig, D. and Brewer, L. (1996) Tri-service procedural guidelines for ecological risk assessments. US Army

Edgewood Research, Development, and Engineering Center, Aberdeen Proving Ground, MD (1996).

WFD (2000) Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. Official Journal of the European Communities.

Wintgens, T., Gallenkemper, M. and Melin, T. (2003) Occurrence and removal of endocrine disrupters in landfill leachate treatment plants. *Water Science and Technology* 48(3): 127-134.

Wright-Walters, M., Volz, C., Talbott, E. and Davis, D. (2011) An updated weight of evidence approach to the aquatic hazard assessment of Bisphenol A and the derivation a new predicted no effect concentration (PNEC) using a non-parametric methodology. *The Science of the Total Environment* 409: 676-685.

Witorsch, R.J. (2002) Endocrine disruptors: can biological effects and environmental risks be predicted? *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 36(1): 118-30.

Yang, P. (2019). Distribution and ecological risk assessment of PEDCs in the water, sediment and *Carex cinerascens* of Poyang Lake wetland, China. *Scientific reports* 9(1): 11302-11302.

Ying, G.-G., Kookana, R.S., Ru, Y.J. (2002) Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International* 28(6): 545–551.

Declaração de Honra

Declaro que a presente dissertação é de minha autoria e não foi utilizada previamente noutro curso ou unidade curricular, desta ou de outra instituição. As referências a outros autores (afirmações, ideias, pensamentos) respeitam escrupulosamente as regras da atribuição, e encontram-se devidamente indicadas no texto e nas referências bibliográficas, de acordo com as normas de referência. Tenho consciência de que a prática de plágio e auto-plágio constitui um ilícito académico.

29 de outubro de 2021

O estudante

Frederico de Nunes e Silva

Frederico Nunes Silva