



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Tecnologia e Ciências
Faculdade de Engenharia

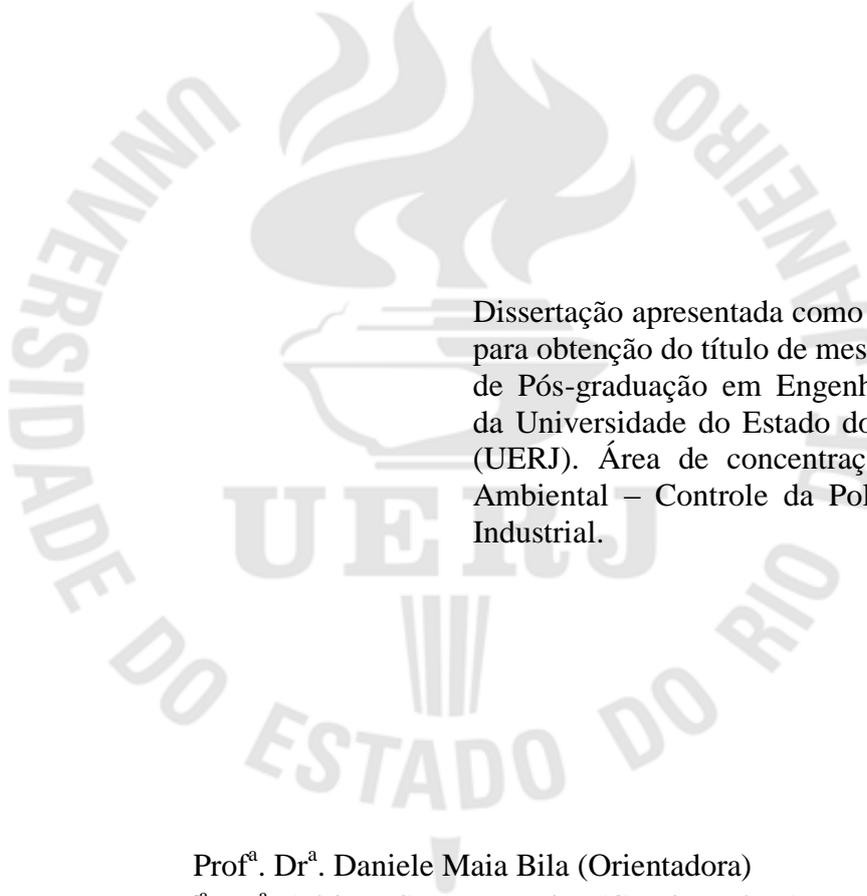
Giselle Gomes Moreira da Silva

**Avaliação da qualidade de águas superficiais e de sedimentos quanto à
toxicidade e atividade estrogênica**

Rio de Janeiro
2015

Giselle Gomes Moreira da Silva

Avaliação da qualidade de águas superficiais e de sedimentos quanto à toxicidade e atividade estrogênica



Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre, ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Área de concentração: Saneamento Ambiental – Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Prof^a. Dr^a. Daniele Maia Bila (Orientadora)
Prof^a. Dr^a. Adriana Sotero Martins (Coorientadora)

Rio de Janeiro
2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/B

S586 Silva, Giselle Gomes Moreira da.
Avaliação da qualidade de águas superficiais e de sedimentos
quanto à toxicidade e atividade estrogênica / Giselle Gomes
Moreira da Silva. – 2015.
118 f.

Orientador: Daniele Maia Bila.
Coorientador: Adriana Sotero Martins.
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Faculdade de Engenharia.

1. Engenharia ambiental. 2. Desreguladores endócrinos na água
- Dissertações. 3. Toxicidade Aguda - Dissertações. 4. Indústria -
Aspectos ambientais - Dissertações. I. Bila, Daniele Maia. II.
Martins, Adriana Sotero. III. Universidade do Estado do Rio de
Janeiro. VI. Título.

CDU 502.51:504.5

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
dissertação.

Assinatura

Data

Giselle Gomes Moreira da Silva

**Avaliação da qualidade de águas superficiais e de sedimentos quanto à toxicidade e
atividade estrogênica**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Saneamento Ambiental – Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Banca examinadora:

Dr.^a. Daniele Maia Bila (Orientadora)
Faculdade de Engenharia - UERJ

Dr.^a. Adriana Sotero Martins (Coorientadora)
ENSP - FIOCRUZ

Dr. Enrico Mendes Saggioro
ENSP - FIOCRUZ

Dr. Geraldo Lippel Sant'Anna Junior
Faculdade de Engenharia - UERJ

Rio de Janeiro
2015

Com muito amor e carinho, dedico este trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus. Agradeço por Ele ter me proporcionado essa oportunidade, por ter guiado meus passos e ter me dado força e capacidade para cumprir mais essa etapa da minha jornada profissional.

Aos meus pais, Mauro e Deyze, por todo amor, carinho, educação e confiança. Agradeço por terem me criado da melhor maneira possível, por acreditarem em mim e por todo incentivo e apoio.

À minha irmã Michelle, por toda ajuda e conselhos sem fins.

À minha querida avó Lina e vovô Tinho †, que sempre me apoiaram nas minhas escolhas.

Aos meus avós Mafalda † e Wastington †, por terem sido tão presentes na minha infância e adolescência ajudando na minha educação e formação.

À melhor orientadora que eu poderia ter: Daniele Bila, agradeço por toda ajuda e pela confiança que sempre demonstrou ter em mim. Não tenho palavras para agradecer, talvez você não saiba o quanto te admiro e o imenso carinho que tenho por ti... Muito obrigada!

À querida coorientadora Adriana Sotero por todo apoio, ajuda e empenho nesse trabalho.

Ao professor uruguaio Javier García pelos ensinamentos e contribuições nesse estudo.

Em especial ao meu namorado João por todo apoio e amparo nos momentos mais difíceis, por todo amor, carinho, e doses de risadas para distrair quando eu mais precisava.

Aos meus sogros Marcos José e Marcia Maria, sim, à vocês que me tratam como filha, eu agradeço pelas conversas, pelo incentivo e pela alegria que sempre demonstram quando falo da minha jornada na vida acadêmica.

Ao Mateus, o melhor “brinde” que eu poderia ter ganhado, agradeço pela motivação que me dava cada vez que perguntava sobre o meu trabalho.

Às “meninas do YES”, Dani Cunha, Mari Barcellos, Mari Luna, Fê Mury, Larissa e Flávia, obrigada por tornarem o final do mestrado mais agradável, fazendo eu me sentir menos sozinha. Em especial à Dani Cunha por toda ajuda, conselho, apoio, conversas e risadas.

À amiga Gabi, que foi um “grande presente” que ganhei do mestrado, por todo incentivo, e por tornar meus dias na UERJ ainda mais agradáveis.

Aos companheiros, Douglas, Jana, Maíra e André, muito obrigada por cada leitura das placas do ensaio YES.

À pequena e grande Louise e ao Márcio por toda ajuda.

À Luciana Griffiero e à Raquel Ramilo por tornarem minha estadia no Uruguai mais fácil.

À FAPERJ pela concessão da bolsa de estudo, sem a qual esse projeto não teria se tornado realidade.

À CAPES pela oportunidade de realizar uma etapa do mestrado no Uruguai.

E a todos que direta e indiretamente, contribuíram para minha formação acadêmica.

Muito Obrigada!

RESUMO

SILVA, Giselle Gomes Moreira. *Avaliação da qualidade de águas superficiais e de sedimentos quanto à toxicidade e atividade estrogênica*. 2015.118 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia Ambiental) - Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Uma série de compostos químicos tem sido classificada como desreguladores endócrinos, tais como pesticidas, produtos químicos empregados e produzidos por indústrias e estrogênios naturais e sintéticos. A presença destes compostos em matrizes ambientais tem gerado cada vez mais preocupação na comunidade científica, em virtude dos seus potenciais efeitos adversos à saúde de várias espécies, uma vez que estas substâncias interferem na produção, liberação, metabolismo e eliminação de hormônios, podendo ainda simular a ação destes. Para a determinação da presença de desreguladores endócrinos podem ser utilizadas diferentes metodologias. Um dos principais ensaios *in vitro* utilizados para determinação da atividade estrogênica é o ensaio YES (*Yeast Estrogen Screen*), um método desenvolvido por Routledge e Sumpter que utiliza a levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada. Neste trabalho foi analisada a presença de atividade estrogênica, através do ensaio YES, em água bruta e potável provenientes do Rio Guandu, localizado no estado do Rio de Janeiro, Brasil, e em água bruta e sedimentos do Rio Santa Lucía localizado no Uruguai. Análises cromatográficas também foram realizadas para as amostras de águas provenientes do Rio Guandu. Testes de ecotoxicidade e parâmetros físico-químicos também foram determinados. Com base nos resultados desse estudo, pode-se dizer que o ensaio YES se mostrou uma importante ferramenta de monitoramento e avaliação da qualidade de águas e sedimentos quanto à presença de atividade estrogênica, sendo $10,13 \pm 3,65 \text{ ng.L}^{-1}$ o limite de detecção do ensaio. Das amostras do Rio Guandu, 75% apresentaram atividade estrogênica, sendo que 20% das amostras de água bruta apresentaram EQ-E₂ superior a 1 ng.L^{-1} . O que é motivo de preocupação, visto que essa concentração já é responsável por efeitos danosos aos seres vivos. As amostras de água potável também apresentaram estrogenicidade, o que indica que o tratamento da água deveria ser otimizado a fim de alcançar a remoção desses micropoluentes prejudiciais à saúde humana e de outros animais. Valores de EQ-E₂ inferiores a 1 ng.L^{-1} foram detectados nas amostras do Rio Santa Lucía, o que não descarta a necessidade de atenção, dado que o efeito sinérgico, em matrizes ambientais, desses micropoluentes é sempre preocupante. Nas amostras submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência, foi possível detectar o composto 17 α -etinilestradiol em 95% delas. Os testes de toxicidade aguda foram ineficientes para predizerem os efeitos causados no meio ambiente por essa classe de micropoluentes. Assim, os ensaios de atividade estrogênica, são os mais indicados para avaliar os efeitos em potencial dos desreguladores endócrinos, por isso, suas metodologias deverão ser completamente dominadas e implantadas como ensaios necessários para avaliar os efeitos de efluentes descartados.

Palavras-chave: Desreguladores endócrinos, ensaio *in vitro* YES, toxicidade aguda, matrizes ambientais.

ABSTRACT

SILVA, Giselle Gomes Moreira. *Evaluation of the quality of surface water and sediment for toxicity and estrogenic activity*. 2015. 118 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia Ambiental) - Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

A number of chemical compounds have been classified as endocrine disruptors, such as pesticides, chemicals used and produced by industries and natural and synthetic estrogens. The presence of these compounds in environmental matrices have increasingly raised concern in the scientific community because of their potential adverse health effects of various species, as these substances interfere with the production, release, metabolism and elimination of hormones and may also simulate the action of these ones. To determine the presence of endocrine disruptors different methodologies may be used. A major *in vitro* assay used to determine the estrogenic activity is the YES assay (Yeast Estrogen Screen), a method developed by Routledge and Sumpter that uses the genetically modified yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In this paper we analyzed the presence of estrogenic activity through the YES assay, in raw and drinking water from the Guandu River, located in the state of Rio de Janeiro, Brazil, and in raw water and sediments of the Santa Lucía River, located in Uruguay. Chromatographic analyzes were also performed for samples of water from the Guandu River. Ecotoxicity tests and physico-chemical parameters were also determined. Based on the results of this study, it can be said that the YES assay proved to be an important monitoring and evaluation tool of water quality and sediments for the presence of estrogenic activity and the detection limit of the assay was $10,13 \pm 3,65 \text{ ng.L}^{-1}$. 75 % of the samples of the Guandu River showed estrogenic activity, and 20 % of raw water samples showed EQ- E₂ higher than 1 ng.L^{-1} . What is cause for concern, since this concentration is already responsible for adverse effects. The drinking water samples also showed estrogenicity, which indicates that the water treatment should be optimized in order to achieve the removal of micropollutants such harmful to human health and other animals. EQ- E₂ values lower than 1 ng.L^{-1} were detected in the samples of Santa Lucía River, which does not rule out the need for attention, since the synergistic effect of these micropollutants in environmental matrices, is always worrying. In the samples subjected to high-performance liquid chromatography with fluorescence detection it was possible to detect the 17 α - ethinylestradiol in 95 % of them. Ecotoxicity tests have been inefficient to predict the effects on the environment caused by this class of micropollutants. Thus, the estrogenic activity assays are best suited to evaluate the potential effects of endocrine disruptors, so their methodologies should be completely dominated and deployed as tests necessary to evaluate the effects of effluents discharged.

Keywords: Endocrine disruptors, *in vitro* assay YES, acute toxicity, environmental matrices.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mecanismo de atuação dos DEs.	22
Figura 2: Estrutura básica dos esteroides.	27
Figura 3: Estrutura química dos hormônios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol, em destaque seus anéis fenólicos que se ligam ao receptor de estrogênio.	28
Figura 4: Esquema do sistema de expressão de atividade estrogênica pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante (ensaio YES).	33
Figura 5: Reações de degradação dos substratos cromogênicos CPRG e ONPG pela enzima β -galactosidase.	33
Figura 6: Bacia hidrográfica do Rio Guandu.	44
Figura 7: Rio Guandu e seus principais afluentes.	45
Figura 8: Local de coleta de água bruta no Rio Gandu.	46
Figura 9: Bacia hidrográfica do Rio Santa Lucía.	47
Figura 10: Pontos de coleta no Rio Santa Lucía.	48
Figura 11: Fluxograma do protocolo de limpeza e descontaminação de vidrarias.	50
Figura 12: Esquema detalhado das etapas de preparo das amostras até o extrato final usado no ensaio YES e na análise de CLAE.	51
Figura 13: Foto dos aparatos de filtração.	52
Figura 14: Foto dos tubos de vidro utilizados no preparo das amostras de sedimento para posterior realização da EFS.	53
Figura 15: Foto do aparato utilizado na EFS.	54
Figura 16: Foto do aparato utilizado na secagem das amostras com fluxo de nitrogênio.	55
Figura 17: Demonstração da disposição do controle positivo (17 β -estradiol), da amostra e do branco (controle negativo) na placa de 96 poços.	60
Figura 18: Placa de ensaio após 72 horas de incubação.	61
Figura 19: Resumo das etapas do ensaio YES.	62
Figura 20: Placa de 96 poços apresentando toxicidade nos primeiros poços das fileiras A, C, E, e G.	65
Figura 21: Interpretação do resultado da equação de toxicidade do ensaio YES.	66
Figura 22: Fluxograma para a expressão dos resultados do ensaio YES.	67
Figura 23: Esquema do horário de inoculação da cepa <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nos frascos de pré inóculo e de inóculo para o ensaio de crescimento da levedura.	69
Figura 24: Curva de crescimento da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante em meio de cultivo do ensaio YES.	73
Figura 25: Espectro de absorção da atividade da enzima β -galactosidase no ensaio YES.	74
Figura 26: Curva dose-resposta padrão do controle positivo 17 β -estradiol no ensaio YES.	75
Figura 27: Valores de CE ₅₀ do controle positivo 17 β -estradiol em todos os ensaios YES realizados no período do estudo.	76
Figura 28: Valores de EQ-E ₂ (ng.L ⁻¹) das amostras de água bruta e potável provenientes do Rio Gandu no período de setembro de 2014 a janeiro de 2015.	77

Figura 29: Valores de EQ-E ₂ das amostras (triplicata) de água coletada em 18/02/2015 no canal San Francisco do Rio Santa Lucía.	78
Figura 30: Valores de EQ-E ₂ das amostras coletadas no Rio Guandu e no Rio Santa Lucía.	82
Figura 31: Curva dose-resposta do composto 17 α -etinilestradiol na faixa de concentração 2724 ng.L ⁻¹ a 1,3301 ng.L ⁻¹	84
Figura 32: Concentração de 17 α -etinilestradiol nas amostras de água bruta e potável provenientes do Rio Guandu.	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Compostos classificados como desreguladores endócrinos.	21
Tabela 2: Efeitos atribuídos aos Desreguladores endócrinos.	23
Tabela 3: Ocorrência do composto 17 α -etinilestradiol em matrizes aquáticas.	26
Tabela 4: Ensaios com diferentes cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante, todos usando receptor de estrogênio como via de sinalização.	36
Tabela 5: Código das amostras do Rio Guandu com localização e data de coleta.	46
Tabela 6: Código das médias das triplicatas das amostras do Rio Santa Lucía.	49
Tabela 7: Parâmetros físico-químicos e suas respectivas metodologias descritas em APHA (2012).	72
Tabela 8: Fases da curva de crescimento observadas na <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante.	73
Tabela 9: Estimativa da Toxicidade das amostras do Rio Guandu e do Rio Santa Lucía.	80
Tabela 10: Máximo valor de EQ-E ₂ e incidência de valores de EQ-E ₂ maiores que 1 ng.L ⁻¹	83
Tabela 11: Parâmetros físico-químicos das águas bruta e potável provenientes do Rio Guandu, coletadas no período de setembro de 2014 a janeiro de 2015.	85
Tabela 12: Parâmetros físico-químicos das amostras de água coletadas no Rio Santa Lucía, nos meses de dezembro de 2014, janeiro e fevereiro de 2015.	86
Tabela 13: Concentrações de 17 α -Etinilestradiol encontradas nas amostras coletadas no Rio Guandu.	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
Ab _S corrigida	Absorbância corrigida
BBP	Butilbenzilftalato
BDE 47	2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter
BDE 99	2,2',4,4',5-pentabromodifenil éter
BDE 100	2,2',4,4',6-pentabromodifenil éter
BDE 153	2,2',4,4',5,5'-hexabromodifenil éter
BDE 154	2,2',4,4',5,6'-hexabromodifenil éter
BDE 209	Decabromodifenil éter
BDE octa	,2',3,4,4',5',6-heptabromodifenil éter octabromodifenil éter
BPA	Bisfenol-A
BPAF	Bisfenol-AF
BPF	Bisfenol-F
CE ₅₀	Concentração que elucida 50% da maior resposta obtida da β -galactosidase no ensaio YES, em relação à curva padrão (*)
CE ₅₀	Concentração que elucida 50% da resposta
CEC	<i>Commission of the European Communities</i>
CL ₅₀	Concentração letal média (concentração para a qual morrem 50% dos indivíduos expostos)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-FLU	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Fluorescência
COD	Carbono orgânico dissolvido
CPR	<i>chlorophenol red</i>
CPRG	<i>chlorophenol red-β-D-galactopyranoside</i>
D.O.	Densidade ótica
DBP	Di-n-butilftalato
DCHP	Dicicloexiloftalato
DDE	2,2 bis-p-clorofenil-1,1-dicloroetileno
DDT	2,2 bis-p-clorofenil-,1, 1,1-tricloroetano
DEHP	Di-2-(2-etil-exil)ftalato
DEP	Dietil ftalato
DEs	Desreguladores endócrinos
DES	Dietilestilbestrol
DIBP	Di-iso-butilftalato
DIDP	Di-iso-decilftalato
DINP	Di-iso-nonilftalato
DIOP	Di-isoetilftalato
DMP	Dimetil ftalato
DOP	Di-n-octilftalato
DQO	Demanda química de oxigênio
E ₁	Estrona
E ₂	17 β -estradiol
E ₂ - VAL	17 β -Estradiol-valerato
E ₃	Estriol
EDC	<i>Endocrine disrupters chemicals</i>
EE ₂	17 α -etinilestradiol

EFS	Extração em fase sólida
ELISA	Imunoabsorção enzimática
EQ-E ₂	Equivalente 17β-estradiol
ERE	Elemento de resposta estrogênica
ETA	Estação de tratamento de água
ETE	Estação de tratamento de esgoto
GC	<i>Gas chromatography</i>
HBCD	Hexabromociclododecano
HPA	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
HPLC	<i>High Performance / Pressure Liquid Chromatography</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IPCS	<i>International Programme on Chemical Safety</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MBP	2,4-bis (4-hidroxifenil)-4-metilpent-1-eno
MÊS	Mestranol
NF	Nonilfenol
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OF	Octilfenol
OGM	Organismo geneticamente modificado
ONP	O-nitrofenol
ONPG	O-nitrofenil β-D-galactopiranosídeo
PBB	Polibromobifenila (PBB)
PCB	Policlorados de bifenilas
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PR	Potência relativa estrogênica
REh	Receptor de estrogênio humano
RIE	Radioimunoensaio
SDT	Sólidos dissolvidos totais
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
SST	Sólidos suspensos totais
TBBA	Tetrabromobisfenol A
TBT	Tributilestanho
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina
TCDF	2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano
TPT	Trifenilestanho
USEPA	<i>United State Environmental Protection Agency</i>
VTG	Vitelogenina
YES	<i>Yeast estrogen screen</i>

(*) Definição de CE₅₀ para o ensaio YES

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
1. OBJETIVOS.....	19
1.1. Geral	19
1.2. Específicos	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1. Desreguladores endócrinos	20
2.2. Atividade estrogênica	26
2.3. Métodos analíticos para determinação de desreguladores endócrinos em matrizes ambientais.....	28
2.4. Uso de ensaios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> para avaliação de atividade estrogênica em amostras ambientais	29
2.4.1. <u>Uso do ensaio <i>in vitro</i> YES para avaliação de atividade estrogênica em amostras ambientais</u>	31
2.4.2. <u>Compilação de resultados de autores que utilizaram ensaios com diferentes cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante, usando receptor de estrogênio como via de sinalização</u>	36
2.5. Ensaio de toxicidade com amostras ambientais	40
2.6. Remoção de desreguladores endócrinos em plantas de tratamento de água	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1. Descrição das áreas de estudo.....	43
3.1.1. <u>Rio Guandu</u>	43
3.1.2. <u>Rio Santa Lucía</u>	47
3.2. Preparo das amostras coletadas para o ensaio <i>in vitro</i> YES e para a cromatografia.....	49
3.2.1. <u>Limpeza das vidrarias</u>	49
3.2.2. <u>Coleta e armazenamento das amostras</u>	50
3.2.3. <u>Primeira parte do processo de preparo das amostras de água: Filtração</u>	52
3.2.4. <u>Primeira parte do processo de preparo das amostras de sedimento</u>	53

3.2.5.	<u>Extração em fase sólida (EFS)</u>	54
3.3.	Ensaio <i>in vitro</i> YES	56
3.3.1.	<u>Reagentes</u>	56
3.3.2.	<u>Preparo das soluções do ensaio YES</u>	56
3.3.3.	<u>Cultivo da cepa <i>Saccharomyces cerevisiae</i></u>	57
3.3.3.1.	Congelamento.....	57
3.3.3.2.	Descongelamento, pré-inóculo e inóculo	57
3.3.4.	<u>Preparo do meio de análise para o ensaio YES</u>	58
3.3.4.1.	Preparo do meio com a cultura de levedura	58
3.3.4.2.	Preparo do meio de análise.....	59
3.3.5.	<u>Procedimento do ensaio YES</u>	59
3.3.6.	<u>Diluições da curva padrão do controle positivo 17β-estradiol</u>	60
3.3.7.	<u>Preparo das placas de ensaio</u>	61
3.3.8.	<u>Concentrações de 17β-estradiol abrangidas na placa de ensaio</u>	63
3.3.9.	<u>Avaliação do limite de detecção (LD)</u>	63
3.3.10.	<u>Análise dos resultados do ensaio YES</u>	63
3.4.	Ensaio de crescimento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	68
3.5.	Quantificação do composto 17α-etinilestradiol por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE-FLU)	69
3.5.1.	<u>Preparo da curva analítica</u>	70
3.5.2.	<u>Avaliação do limite de detecção (LD)</u>	70
3.5.3.	<u>Avaliação do limite de quantificação (LQ)</u>	70
3.6.	Ensaio de toxicidade aguda	70
3.6.1.	<u>Organismo-teste: <i>Aliivibrio fischeri</i></u>	71
3.6.2.	<u>Organismo-teste: <i>Daphnia similis</i></u>	71
3.6.3.	<u>Organismo-teste: <i>Danio rerio</i></u>	71
3.7.	Parâmetros físico-químicos	72
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.1.	Crescimento da cepa <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante	73
4.2.	Ensaio YES	74
4.2.1.	<u>Controle positivo 17β-estradiol</u>	75
4.2.2.	<u>Determinação da atividade estrogênica nas amostras do Rio Guandu</u>	76
4.2.3.	<u>Determinação da atividade estrogênica das amostras do Rio Santa Lucía, Uruguai</u>	78
4.2.4.	<u>Inibição do crescimento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por toxicidade da amostra</u>	79
4.2.5.	<u>Comparação da atividade estrogênica entre Rio Guandu e Rio Santa Lucía</u>	81
4.2.6.	<u>Atividade estrogênica do composto 17 α-etinilestradiol</u>	83

4.3.	Caracterização físico-química das amostras.....	84
4.3.1.	<u>Rio Guandu</u>.....	84
4.3.2.	<u>Rio Santa Lucía</u>	86
4.4.	Ensaio de toxicidade.....	86
4.5.	Quantificação do composto 17α-etinilestradiol em amostras do Rio Guandu.....	87
5.	CONCLUSÃO	91
	REFERÊNCIAS.....	92
	ANEXO 1: Preparo das soluções do ensaio YES	102
	ANEXO 2: Curvas dose-resposta das amostras de água bruta e potável do Rio Guandu....	104
	ANEXO 3: Curvas dose-resposta das médias com desvios das triplicatas mensais de amostras de água bruta e sedimento de cada ponto do Rio Santa Lucía, Uruguai.....	108
	ANEXO 4: Curva analítica desenvolvida para a análise do composto 17α-etinilestradiol por CLAE-FLU.....	111
	ANEXO 5: Cromatogramas das amostras submetidas à cromatografia líquida com detector de fluorescência.....	112

INTRODUÇÃO

Ainda que a contaminação química da água, ar, solo e alimentos não seja um problema novo, desde alguns anos tem se detectado a presença de certos compostos químicos ou contaminantes não regulamentados, de origem antrópica ou natural, os quais têm se dispersado no meio ambiente e estão emergindo em águas superficiais e subterrâneas, inclusive em água potável, e podem constituir um risco à saúde dos seres vivos. Esses compostos denominados como “contaminantes emergentes” se apresentam em baixas concentrações, na ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$ e ng.L^{-1} e muitos deles não são regulamentados na maioria dos países (KUSTER et al., 2008).

Dentro deste variado grupo de compostos, se encontram os desreguladores endócrinos (DEs), ou em inglês “*Endocrine Disrupters Chemicals*” (EDC), entre os quais se incluem pesticidas, produtos químicos industriais, farmacêuticos, cosméticos e fitoestrogênios.

Os DEs são definidos pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*United State Environmental Protection Agency - USEPA*) como “*um agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento*” (USEPA, 1997).

Já o Programa Internacional de Segurança Química (*International Programme on Chemical Safety - IPCS*) em conjunto com o Japão, os EUA, o Canadá, a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (*Organisation for Economic Co-operation and Development - OECD*) e a União Europeia, definiram: “*Um desregulador endócrino é uma substância ou um composto exógeno, que altera uma ou várias funções do sistema endócrino e tem, conseqüentemente, efeitos adversos sobre a saúde num organismo intacto, sua descendência, ou (sub) populações*” (COM (1999) 706).

Os DEs são responsáveis por uma série de alterações no sistema endócrino, eles possuem diversos mecanismos de ação, podendo mimetizar a ação dos hormônios endógenos, antagonizar sua ação, alterar seu padrão de síntese e metabolismo, e modular os níveis dos receptores correspondentes (BILA, 2005; SONNENSCHNEIN e SOTO, 1998). Em suma, são substâncias capazes de bloquear ou estimular o sistema endócrino dos seres vivos, influenciando no crescimento, desenvolvimento, reprodução e comportamento.

Os DEs são constituídos por uma ampla variedade de compostos, cuja complexidade e heterogeneidade têm dificultado a implementação de técnicas para a sua determinação analítica, bem como o estudo do seu comportamento no meio ambiente (SONNENSCHNEIN e SOTO, 1998). Além disso, ainda há grande dificuldade na identificação desses compostos em matrizes ambientais, devido à ocorrência de amostras complexas, havendo a possibilidade de ocorrer ações simultâneas por parte de alguns DEs, o que dificulta ainda mais a identificação desses compostos e a investigação de seus mecanismos de ação.

Por esta razão, em muitos países, a valorização desse problema e o impacto que estes compostos podem gerar, muitas vezes, não têm sido dimensionados apropriadamente, apesar das publicações em nível mundial. Além disso, é importante salientar que não há uma regulamentação específica para os DEs, não havendo a exigência da determinação de todos esses compostos em matrizes ambientais, razão pela qual não se conhece a fundo a dimensão desse problema.

Devido à grande dificuldade de se determinar esses compostos, métodos analíticos foram desenvolvidos para a determinação, identificação e quantificação dessas substâncias em matrizes ambientais, porém somente métodos analíticos não são suficientes, é necessário o conhecimento do efeito dessas substâncias nos seres vivos. Para isso, os ensaios *in vivo* e *in vitro* se tornam fundamentais. A utilização desses métodos em conjunto permite confirmar a atividade biológica e identificar os compostos responsáveis.

No presente estudo foi analisada a atividade estrogênica das águas superficiais e da água tratada (potável) provenientes do Rio Guandu, localizado no Rio de Janeiro, Brasil. Além disso, foram analisadas amostras de águas superficiais e sedimentos do Rio Santa Lucía, localizado no departamento de Lavalleja, na cidade de Minas no Uruguai. Para isso foi usado o ensaio *in vitro* “*Yeast Estrogen Screen*” (YES) como ferramenta de monitoramento. Em conjunto com o ensaio YES, técnicas analíticas, estudos físico-químicos e de toxicidade também foram realizados.

Para elaboração dessa dissertação a estrutura do texto foi organizada da seguinte forma: Introdução; 1. Objetivos; 2. Revisão bibliográfica; 3. Materiais e métodos; 4. Resultados e discussões; 5. Conclusão; Referências Bibliográficas e Anexos, respectivamente.

1. OBJETIVOS

1.1. Geral

Investigar o uso do ensaio *in vitro* “*Yeast Estrogen Screen*” (YES) como ferramenta de monitoramento e avaliação da qualidade de águas e sedimentos quanto à presença de atividade estrogênica.

1.2. Específicos

- Definir a melhor fase da curva de crescimento da levedura, *Saacharomyces cerevisiae* recombinante, para a realização do ensaio YES.
- Avaliar e determinar a atividade estrogênica em amostras de água superficial e água tratada (potável) provenientes do Rio Guandu (Rio de Janeiro – Brasil) e em águas superficiais e sedimentos do Rio Santa Lucía (Uruguai);
- Avaliar a estrogenicidade do composto 17 α -etinilestradiol pelo ensaio YES;
- Determinar a toxicidade aguda das amostras de água superficial e água tratada (potável) provenientes do Rio Guandu (Rio de Janeiro – Brasil);
- Quantificar o composto 17 α -etinilestradiol em amostras de água superficial e água tratada (potável) provenientes do Rio Guandu (Rio de Janeiro – Brasil);

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Desreguladores endócrinos

A produção e o uso crescente de compostos químicos têm gerado um aumento da incidência de contaminantes emergentes no meio ambiente. Esses contaminantes são compostos que têm sido detectados nos diversos compartimentos ambientais (ar, água e solo).

Juntamente com o aumento da produção e uso desses compostos químicos há o desenvolvimento e avanço de tecnologias analíticas, as quais permitem a detecção de um maior número de micropoluentes, fazendo com que a caracterização e mensuração da contaminação ambiental, por esses compostos, sejam cada vez maiores.

Esses contaminantes, mesmo podendo gerar riscos e danos ao meio ambiente, não estão incluídos em programas de monitoramento de rotina, ou seja, essa classe de compostos ainda não foi incluída na legislação de muitos países, porém são candidatos a uma futura regulamentação, dependendo de resultados obtidos em estudos ecotoxicológicos, efeitos à saúde humana e animal, potencial de bioacumulação, transporte e destino no ambiente, além da quantidade e concentração que são lançados no meio ambiente (PETROVIC e BARCELÓ, 2006).

Dentre os contaminantes emergentes existe uma classe capaz de alterar e causar danos às funções do sistema endócrino dos seres vivos e, conseqüentemente, causar efeitos adversos em organismos saudáveis e seus descendentes. Essa classe é chamada de desreguladores endócrinos (DEs). Eles podem pertencer a diferentes ordens químicas como, por exemplo: ftalatos, alquilfenóis, compostos orgânicos de estanho, parabenos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), pesticidas, furanos e dioxinas, policlorados de bifenilas (PCB), retardantes de chama bromados, bisfenol, agentes terapêuticos, fármacos e estrogênios naturais (Tabela 1) (BILA e DEZOTTI, 2007).

Os DEs podem ser encontrados no meio ambiente, tais como: águas superficiais e de subsolo, sedimentos marinhos, solo, efluentes de Estação de tratamento de esgoto (ETE) e lodo biológico das ETE. As concentrações dessas substâncias, apesar de baixas, são relevantes (BILA e DEZOTTI, 2003), podendo afetar a qualidade da água, a saúde dos ecossistemas e potencialmente impactar o suprimento de água potável.

Tabela 1: Compostos classificados como desreguladores endócrinos.

Ftalatos	Pesticidas	
	<u>Inseticidas</u>	<u>Fungicidas</u>
Dietil ftalato (DEP)	2,2 bis-p-clorofenil-1, 1,1-	Vinclozolina
Dimetil ftalato (DMP)	tricloroetano (DDT)	Tridemorfos
di-iso-butilftalato (DIBP)	2,2 bis-p-clorofenil-1,	Carbendazime
di-n-butilftalato (DBP)	1-dicloroetileno (DDE)	Penconazol
butilbenzilftalato (BBP)	Lindane (1,2,3,4,5,6-	Procloraz
dicicloexiloftalato (DCHP)	hexacloroexano)	Procimidona
di-2-(2-etil-exil)ftalato (DEHP)	Deltametrin	Epoxiconazol
di-n-octilftalato (DOP)	Carbofurano	Propiconazol
di-iso-octilftalato (DIOP)		
di-iso-nonilftalato (DINP)	<u>Herbicidas</u>	
di-iso-decilftalato (DIDP)	Atrazina	
	Linuron	
Alquilfenóis	Organoclorados	
Nonilfenol (NF)	Dibenzo-p-dioxina	
Octilfenol (OF)	2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina (TCDD)	
Nonilfenol etoxilado	2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano (TCDF)	
Octilfenol etoxilado		
Compostos orgânicos de estanho	Policlorados de bifenilas	
Tributilestanho (TBT)	2,4,4'-triclorobifenil	
Trifenilestanho (TPT)	2,2',5,5'-tetraclorobifenil	
Parabenos	2,2',4,5,5'-pentaclorobifenil	
Benzilparabeno	2,3',4,4', 5-pentaclorobifenil	
Butilparabeno	2, 2',3,4,4',5'-hexaclorobifenil	
Etilparabeno	2,2',4,4',5, 5'-hexaclorobifenil	
Isobutilparabeno	2,2',3,4,4',5,5'-heptaclorobifenil	
n-propilparabeno		
metilparabeno		
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	Retardantes de chama bromados	
Naftalina	Polibromobifenila (PBB)	
Acenaftileno	2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter (BDE 47)	
Acenafteno	2,2',4,4',5-pentabromodifenil éter (BDE99)	
Fluoreno	2,2',4,4',6-pentabromodifenil éter (BDE100)	
Fenantreno	2,2',4,4',5,5'-hexabromodifenil éter (BDE 153)	
Antraceno	2,2',4,4',5,6'-hexabromodifenil éter (BDE 154)	
Fluoranteno	2,2',3,4,4',5',6-heptabromodifenil éter	
Pireno	Octabromodifenil éter (BDE octa)	
Benzo[a]antraceno	Decabromodifenil éter (BDE 209)	
Criseno	Hexabromociclododecano (HBCD)	
Benzo[b]fluoranteno	Tetrabromobisfenol A (TBBA)	
Benzo[k]fluoranteno	Bisfenol	
Benzo[a]pireno	Bisfenol A	
Indeno[123-cd]pireno	Estrogênios naturais	
Dibenzo[ah]antraceno	Estrona (E ₁)	
Benzo[ghi]perileno	17β-estradiol (E ₂)	
Agentes terapêuticos e farmacêuticos	<u>Fitoestrogênios</u>	
Dietilestilbestrol (DES)	<u>Isoflavona</u>	
17α-etinilestradiol (EE2)	daidzeína e genisteína	
	<u>Lignan</u>	
	Metaresinol, enterodiol, enterolactona	

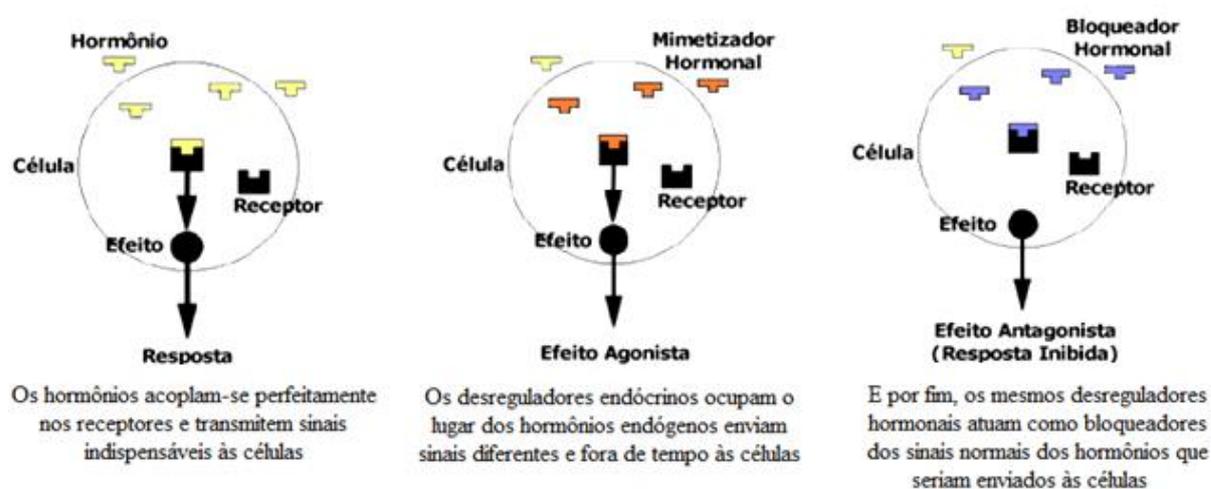
Fonte: Adaptado de Bila e Dezotti, 2007.

Mathiessen et al. (2006) e Routledge et al. (1998) também estudaram a classe dos DEs e relataram que a concentração de 1 ng.L^{-1} de estrogênios já está associada a efeitos danosos aos seres vivos, o que ratifica que essas substâncias mesmo em baixas concentrações são capazes de provocarem efeitos negativos e danos ao meio ambiente.

Esses compostos agem no sistema endócrino, o qual é composto por glândulas e tecidos que secretam substâncias químicas responsáveis pelo controle da maioria das funções biológicas. As substâncias secretadas são chamadas de hormônios e atuam ligando-se a receptores específicos para realização de tarefas pré-determinadas, sendo responsáveis pelo crescimento, funcionamento e regulação de vários órgãos, mantendo assim o equilíbrio e funcionamento de um organismo, eles atuam acoplando-se perfeitamente aos receptores e transmitindo sinais indispensáveis às células.

Quando há a presença de DEs, estes podem competir com os hormônios e agir por mecanismos fisiológicos pelos quais substituem os hormônios do organismo (agonistas) enviando sinais diferentes e fora do tempo às células, ou podem bloquear a ação natural desses hormônios (antagonistas), (Figura 1) ou ainda, podem aumentar ou diminuir a quantidade original de hormônios, e assim alterar as funções endócrinas (SANTAMARTA, 2001).

Figura 1: Mecanismo de atuação dos DEs.



Fonte: Adaptado de (BIRKETT e LESTER, 2003).

Independente do mecanismo de ação, ao agir no sistema endócrino, essas substâncias provocam efeitos adversos, tais como diminuição na eclosão de ovos de pássaros, peixes e tartarugas; feminização de peixes machos; deformidade em peixes; problemas no sistema reprodutivo em répteis, pássaros e mamíferos; e alterações no sistema imunológico de mamíferos marinhos (CUNHA, 2013). Em alguns casos, esses efeitos podem conduzir a mudanças na dinâmica da população e até mesmo ao declínio da população. A Tabela 2 apresenta alguns dos efeitos destas substâncias compilados da literatura.

Tabela 2: Efeitos atribuídos aos Desreguladores endócrinos.

Classe/Animal	Contaminante	Efeitos observados	Referência
Anfíbio	17 β -estradiol e 4-terc-octilfenol	Alteração no comportamento sexual em machos.	SCHWENDIMAN e PROPPER, 2012
	Tetrabromobisfenol A	Interferência na sinalização hormonal da tireóide	FINI et al., 2012
	Nonifenol	Interferência na atividade da glândula adrenal.	CAPALDO et al., 2012
	PCB	Retardo da metamorfose.	ISHIHARA et al., 2011
	Octilfenol	Feminização.	PORTER et al., 2011
	Tributilestanho	Malformações múltiplas em embriões.	GUO et al., 2010
Réptil	Nonifenol	Indução da síntese de vitelogenina em machos.	VERDERAME et al., 2011
	17 β -estradiol, bisfenol A, endosulfan e atrazina	Alterações nas gônadas e na dinâmica folicular em fêmeas.	STOKER et al., 2008
	Endosulfan e atrazina	Redução do peso dos ovos.	BELDOMENICO et al., 2007
Tartaruga	PCB	Mortalidade da espécie.	EISENREICH et al., 2009
	17 β -estradiol	Indução da síntese de vitelogenina em machos.	SIFUENTES-ROMERO et al., 2006
	DDT	Atraso na maturação dos ovócitos.	BINELLI et al., 2004

(Continua)

Tabela 2: Efeitos atribuídos aos Desreguladores endócrinos (continuação).

Classe/Animal	Contaminante	Efeitos observados	Referência
Mamífero	Bisfenol A	Deformidades no sistema reprodutivo de ratos.	MARKEY et al., 2003
		Câncer de próstata e esperma diminuído em homens. Síndrome do ovário policístico, aumento da liberação de prolactina em mulheres.	TESKE e ARNOLD, 2008
	Nonilfenol	Diminuição da produção de espermatozoides em homens	
	17 α -etinilestradiol	Câncer de próstata em homens.	
	PCB	Alta mortalidade de golfinho.	AGUILAR e BORREL, 1994
	DDT	Anomalias no sistema reprodutivo de ratos.	BITMAN et al., 1968
Mexilhão	17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e benzoato de estradiol	Indução da síntese de vitelogenina em machos.	CIOCAN et al., 2010
	17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, mestranol, nonilfenol, bisfenol A e benzofenona	Alteração funcional da glândula digestiva.	CANESI et al., 2008
Peixe	Alquilfenóis e ftalatos	Indução da síntese de vitelogenina e feminização.	PUY-AZURMENDI et al. 2013
	Pesticidas	Feminização e redução no sucesso reprodutivo.	TIAN et al., 2012
	17 α -etinilestradiol e bisfenol A	Inibição da expressão de genes esteroideogênicos nas gônadas.	LIU et al., 2012
	Benzotriazol	Alterações bioquímicas.	TANGTIAN et al., 2012
	Bisfenol A, nonilfenol, 17 β -estradiol	Efeitos na expressão do gene GnRH e no desenvolvimento embrionário.	LEE et al., 2012

(Continua)

Tabela 2: Efeitos atribuídos aos Desreguladores endócrinos (continuação).

Classe/Animal	Contaminante	Efeitos observados	Referência
Peixe	17 β -estradiol, dietilestilbestrol e nonilfenol	Indução da síntese de vitelogenina e redução dos testículos.	JIN et al., 2012
	Bisfenol A	Diminuição da qualidade do esperma e indução da síntese de vitelogenina.	HATEF et al., 2012
		Indução de malformações de otólitos.	GIBERT et al., 2011
	4-nonilfenol	Interferência no desenvolvimento embrionário	CHANDRASEKAR et al., 2011
	β -endosulfan	Indução da síntese de vitelogenina e alteração na função reprodutiva.	HAN et al., 2011

Fonte: Adaptado de Cunha, 2013.

Embora as concentrações dessas substâncias encontradas em matrizes ambientais sejam baixas (na ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$ e ngL^{-1}), estas são suficientemente elevadas para produzir efeitos danosos, como por exemplo, o desenvolvimento de câncer de próstata e esperma diminuído em homens, síndrome do ovário policístico e aumento da liberação de prolactina em mulheres; além de outros danos em diversos tipos de organismos terrestres e aquáticos, conforme visto na Tabela 2. E ainda, os efeitos causados no sistema reprodutivo de algumas espécies de animais podem conduzir a uma diminuição do tamanho da população a um nível crítico, o qual pode, eventualmente, causar a extinção da população.

O composto 17 α -etinilestradiol é responsável por desregulação endócrina em diversos seres vivos, conforme exposto na Tabela 2. A substância 17 α -etinilestradiol é um fármaco, um estrogênio sintético usado principalmente em contraceptivos orais.

A Tabela 3 apresenta as faixas de concentrações em que essa substância foi encontrada em matrizes aquáticas em alguns estudos publicados na literatura.

Essas concentrações presentes no meio ambiente, embora muito baixas, são suficientes para elucidar uma resposta hormonal em uma variedade de animais, tais como peixes machos

expostos a baixíssimos níveis de estrogênios ($1,0 \text{ ng.L}^{-1}$), seja intermitente ou continuamente, exibem respostas estrogênicas, tal como a indução à síntese da proteína vitelogenina (VTG) (MATTHIESSEN et al., 2006; HANSEN et al., 1998; ROUTLEDGE et al., 1998).

Tabela 3: Ocorrência do composto 17α -etinilestradiol em matrizes aquáticas.

Substância	Localidade	Concentração	Referência
17α -etinilestradiol	Lagoa de Araruama RJ / Brasil	Não detectado ou abaixo do LD.	LUCENA, 2013
	Rios Paraíba do Sul, Macaé, Guandu, Lagoa Rodrigo de Freitas e Lagoa de Jacarepaguá - RJ / Brasil	Não detectado ou abaixo do LD.	KUSTER et al., 2009
	Afluente de ETE/Espanha	Não detectado ou abaixo do LD.	KUSTER et al., 2008
	Efluente de ETE/Espanha		
	Água superficial		
	Água potável		
	Afluente de ETE/França	$5 - 7 \text{ ng.L}^{-1}$	CARGOUËT et al., 2004
	Efluente de ETE/França	$3 - 4,5 \text{ ng.L}^{-1}$	
	Água superficial/França	$1 - 3 \text{ ng.L}^{-1}$	
	Água natural EUA	$0,2 \text{ ng.L}^{-1}$	KOLPIN et al., 2002
Efluente de ETE/Itália	$0,3 - 1,7 \text{ ng.L}^{-1}$	BARONTI et al., 2000	

LD: Limite de detecção

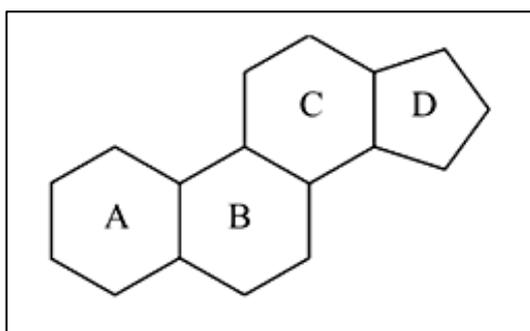
2.2. Atividade estrogênica

A atividade estrogênica pode ser definida como a capacidade de produção de respostas biológicas qualitativamente similares àquelas produzidas pelos estrogênios, como o 17β -estradiol, o qual muitas vezes é utilizado como padrão de comparação em ensaios *in vitro*. Ou seja, atividade estrogênica é a capacidade de uma substância se ligar a um receptor de estrogênio e elucidar uma resposta (BILA, 2005).

Os DEs com atividade estrogênica podem ser divididos em duas classes principais: estrogênio natural e xenoestrogênios (substâncias sintéticas com atividade estrogênica). Os estrogênios naturais incluem estrona (E_1), 17β -estradiol (E_2) e estriol (E_3) e também os fitoestrogênios. Enquanto que no grupo dos xenoestrogênios estão incluídos os fármacos dietilestilbestrol (DES), utilizado para evitar o aborto, e o 17α -etinilestradiol (EE_2), usado como contraceptivo e medicamento para a reposição hormonal, além de outros produtos químicos com diversos usos, tais como plastificantes, produtos de degradação de surfactantes não-iônicos, ftalatos, certos pesticidas, compostos fenólicos, entre outros (BECK et al., 2006).

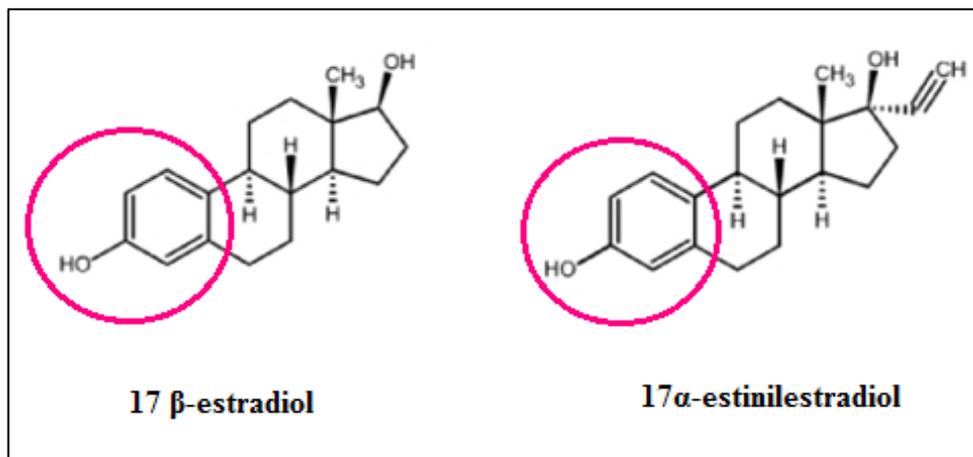
Segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), os hormônios esteroides possuem uma estrutura química básica de 17 átomos de carbono dispostos em quatro anéis ligados entre si (A, B, C e D), estrutura conhecida como ciclo-pentano-peridro-fenantreno (Figura 2). O anel fenólico A é por onde ocorre a ligação aos receptores de estrogênios. Esta estrutura pode conter ligações duplas, metilas, carbonilas e hidroxilas que darão origem a uma série de hormônios esteroides derivados (RAIMUNDO, 2007).

Figura 2: Estrutura básica dos esteroides.



O hormônio 17α -etinilestradiol é o estrogênio sintético mais utilizado como contraceptivo (CUNHA, 2013), ele foi desenvolvido a partir da adição de um radical etinil à molécula de 17β -estradiol, no carbono 17 (Figura 3). Esta diferença faz com que o 17α -etinilestradiol possua maior potencial estrogênico e também se torne mais resistente à degradação com relação ao composto original (COMBALBERT e HERNANDEZ-RAQUET, 2010; IARC, 2007).

Figura 3: Estrutura química dos hormônios 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol, em destaque seus anéis fenólicos que se ligam ao receptor de estrogênio.



2.3. Métodos analíticos para determinação de desreguladores endócrinos em matrizes ambientais

A determinação de DEs no meio ambiente é bastante difícil devido à complexidade das matrizes ambientais e a baixa concentração desses compostos presentes no meio ambiente, mas que ainda assim são fisiologicamente ativos. Portanto, na maioria das análises que envolvem amostras ambientais, é necessário realizar a extração e concentração dos analitos para se isolar os compostos alvos da matriz e atingir os limites de detecção e quantificação necessários.

Também, devido à presença em baixas concentrações (níveis traço: $\mu\text{g.L}^{-1}$ a ng.L^{-1}), para se obter bons resultados, procedimentos básicos como: o transporte e estocagem adequados das amostras, além da limpeza da vidraria utilizada devem ser sempre realizados.

Um procedimento analítico típico inclui, portanto, vários passos para preparação da amostra, que vai desde a limpeza da vidraria até métodos, tais como filtração, extração, purificação e evaporação (REIS FILHO et al., 2006).

Em análises de matrizes aquáticas, uma técnica bastante utilizada é a extração em fase sólida (EFS, ou em inglês: “SPE: *Solid Phase Extraction*”), na qual ocorre pré-concentração dos compostos a serem analisados, isso porque, conforme dito, os DEs encontram-se em

baixas concentrações no meio ambiente, então essa se torna uma etapa importante e necessária para que se alcance o limite de detecção das análises.

Esta técnica além de permitir a extração eficiente e a concentração dos analitos, possibilita uma pré-purificação. A EFS é uma técnica de extração simples, rápida e que requer pequena quantidade de solvente. A EFS implica na percolação da amostra através do adsorvente, onde os analitos de interesse da amostra ficam retidos. Em seguida, os analitos são eluídos com solvente apropriado (AQUINO e NUNES, 2003).

Após a EFS, as amostras são submetidas a análises químicas como a cromatografia, que é uma técnica físico-química de separação, e está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária (DEGANI et al., 1998).

Algumas técnicas cromatográficas são: Cromatografia gasosa (*gas chromatography*, GC) ou cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance / Pressure Liquid Chromatography*, HPLC; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, CLAE), podendo ser seguidas por acoplamento de várias fontes de ionização e detectores (RODRIGUES, 2012). O desenvolvimento dos métodos, em geral, é um pouco dispendioso e de longa duração, além de requerer procedimentos extensos de limpeza de vidraria.

2.4. Uso de ensaios *in vitro* e *in vivo* para avaliação de atividade estrogênica em amostras ambientais

É grande o número de ensaios *in vitro* e *in vivo* desenvolvidos e em desenvolvimento para a análise da presença e dos efeitos dos DEs no meio ambiente. Nesses ensaios ocorre exposição de organismos à ação dos DEs, empregando-se cultura de células (*in vitro*) ou animais de laboratório (*in vivo*).

Os ensaios *in vitro* possuem certa vantagem em relação aos *in vivo*, primeiro por não utilizarem animais e segundo porque são mais rápidos e mais econômicos. Além disso, têm fatores positivos como simplicidade, sensibilidade e especificidade. Podem ser utilizados para misturas complexas, o que inclui amostras ambientais, sendo de grande valia tanto para a

análise de grande número de substâncias químicas como de grande quantidade de amostras ambientais.

Os ensaios *in vivo* avaliam os efeitos dos DEs sobre os seres vivos pela medição de parâmetros característicos, seja sobre a anatomia, como anormalidades das gônadas ou medindo os níveis de expressão proteica e atividade enzimática, como a produção de vitelogenina em peixes machos. Já os ensaios *in vitro* são baseados em mecanismos de ação que elucidam respostas e utilizam pontos mais definidos, como a interação com receptores hormonais (ensaio YES – *Yeast Estrogen Screen*) e a proliferação celular (*E-Screen*). Contudo, ensaios *in vitro* são complementares e não substitutos dos ensaios *in vivo*, o conjunto desses ensaios é requerido para uma melhor análise do potencial de risco dos DEs presentes no meio ambiente (BILA, 2005).

Dentre os ensaios *in vivo* podem-se citar os realizados com peixes como o mais frequentemente utilizado, uma vez que apresentam menor custo e complexidade (SOTO et al., 1995).

Nos ensaios com peixes é mensurada a capacidade dos compostos em questão induzirem à síntese de vitelogenina (VTG), um biomarcador específico, no plasma sanguíneo de peixes machos. A VTG é uma proteína presente na circulação sistêmica em espécies de animais ovíparos, estando presente em machos e fêmeas. Em organismos machos, em condições normais, a síntese de VTG é muito baixa ou não detectada, possivelmente, devido à baixa concentração de estrogênio no sangue. Entretanto, quando peixes machos são expostos à substâncias estrogênicas, eles são capazes de produzir uma grande quantidade de VTG, similarmente às fêmeas e, conseqüentemente, há um aumento da concentração desta proteína no plasma sanguíneo (SCHMID et al., 2002; FOLMAR et al., 2000; JOHNSON et al., 2000; HANSEN et al., 1998).

O ensaio de indução da síntese de VTG é muito utilizado para medir a exposição estrogênica em ambientes aquáticos. É um ótimo demonstrativo de efeitos endócrinos em peixe. Este ensaio não demanda longo período de tempo, não exige altos custos financeiros e mostra uma resposta que pode ser facilmente medida por radioimunoensaio (RIE) ou por imunoadsorção enzimática (ELISA) (BILA, 2005), podendo também a VTG ser mensurada pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Além de peixes, outros organismos também são usados para avaliar a atividade estrogênica via indução da síntese da proteína VTG, tais como pássaros, anfíbios e répteis (OECD, 2002).

Dos ensaios *in vitro*, os mais referenciados são o *E-screen* e os ensaios que utilizam cepas de *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes que possuem um receptor de estrogênio como via de sinalização, dentre esses ensaios o mais utilizado é o YES.

O ensaio *E-screen* utiliza a proliferação celular para determinar a estrogenicidade da amostra. É realizada a quantificação da mitose de células cancerígenas mamárias (MCF-7), quando em contato com compostos estrogênicos (SOTO et al., 1995). A mensuração da proliferação das células é determinada pela contagem do número de células, ou núcleos ou por método colorimétrico (KÖRNER et al., 1998; SOTO et al., 1995).

2.4.1. Uso do ensaio *in vitro* YES para avaliação de atividade estrogênica em amostras ambientais

O ensaio *in vitro* YES é um bioensaio que permite a indicação da atividade estrogênica da amostra, e corresponde à resposta a diferentes compostos em conjunto. Essa é uma característica positiva do ensaio, pois em amostras ambientais é difícil a detecção de todos os compostos por técnicas analíticas (VILLENEUVE et al., 2000), além de ser dispendioso.

Assim como as análises químicas (cromatografia), o ensaio YES também necessita de uma pré-concentração dos compostos a serem analisados. Portanto, previamente ao ensaio é realizada a EFS da amostra ambiental a ser analisada, isso porque, conforme já dito anteriormente, os DEs encontram-se em baixas concentrações no meio ambiente, então essa se torna uma etapa necessária para que o limite de detecção do método seja alcançado.

O ensaio YES utiliza a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A cepa foi construída por técnicas de engenharia genética e encontra-se disponibilizada pela Glaxo Group Research (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996). A cepa utilizada no processo de transformação foi a BJ1991 (BISTAN et al., 2012). Este método, desenvolvido por Routledge e Sumpter, vem sendo largamente empregado devido à rapidez, à reprodutibilidade e à sensibilidade.

A sequência de DNA do receptor de estrogênio humano (REh) foi inserida no genoma da levedura, sob a indução do promotor *Lac-Z* e com isso esse ensaio é capaz de analisar a estrogenicidade da amostra, ou seja, a capacidade que a mesma possui em interagir com o receptor de estrogênio humano e produzir uma resposta (BISTAN et al., 2012; SILVA et al., 2002; BERESFORD et al., 2000; PAYNE et al., 2000; ROUTLEDGE; SUMPTER, 1996).

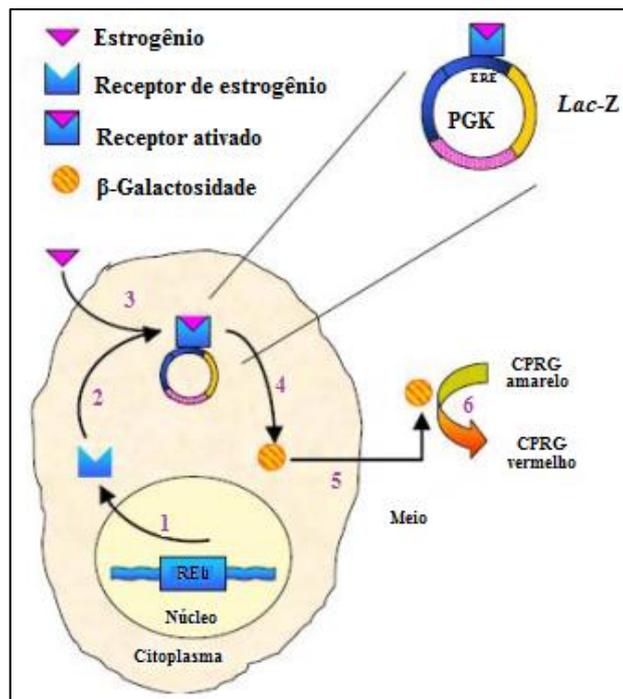
O composto com potencial atividade estrogênica presente na amostra se une ao receptor hormonal, o qual se converte em um receptor ativo, este por sua vez estimula o ativador transcripcional e se expressa em gene repórter que induz a expressão da β -galactosidase, liberando-a ao meio. O substrato cromogênico *chlorophenol red- β -D-galactopyranoside* – CPRG (que possui coloração amarela) é degradado pela β -galactosidase até o produto final *chlorophenol red* – CPR (que possui coloração vermelha), dando coloração vermelho/rosado ao meio (BERESFORD et al., 2000; ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996) (Figura 4 e Figura 5).

Routledge e Sumpter (1996) afirmam que a β -galactosidase é liberada diretamente ao meio, porém não explicam como ocorre a secreção dessa enzima, visto que a literatura reporta o fracasso na tentativa de secreção da β -galactosidase em *Saccharomyces cerevisiae* (DOMINGUES et al., 2010). Caso essa afirmativa feita por Routledge e Sumpter (1996) realmente seja verdadeira, o ensaio YES adquire certa vantagem em relação a outros ensaios, que utilizam levedura recombinante para medir a estrogenicidade, reportados por Metcalfe et al. (2013), Lorenzen et al. (2004), Gaido et al. (1997), nos quais a β -galactosidase é retida dentro da célula da levedura, sendo necessário utilizar a célula lisada (rompida) ou permeabilizada para que a enzima seja liberada ao meio.

Não é somente o substrato CPRG que pode ser utilizado para se obter a resposta do ensaio, o substrato ONPG (o-nitrofenil β -D-galactopiranosídeo), foi utilizado por outros autores (METCALFE et al., 2013, LORENZEN et al., 2004, GAIDO et al., 1997). Esse substrato cromogênico, ONPG, não possui coloração (transparente) e o processo funciona da mesma maneira, porém sendo a coloração final diferente, pois o ONPG quando degradado pela β -galactosidase produz o-nitrofenol (ONP), dando coloração amarela ao meio e assim indicando a presença de atividade estrogênica (Figura 5).

Nesse estudo optou-se pelo uso do substrato cromogênico CPRG, pois foi o utilizado por Routledge e Sumpter (1996), além disso, o CPRG é dez vezes mais sensível que o ONPG (EUSTICE et al., 1991).

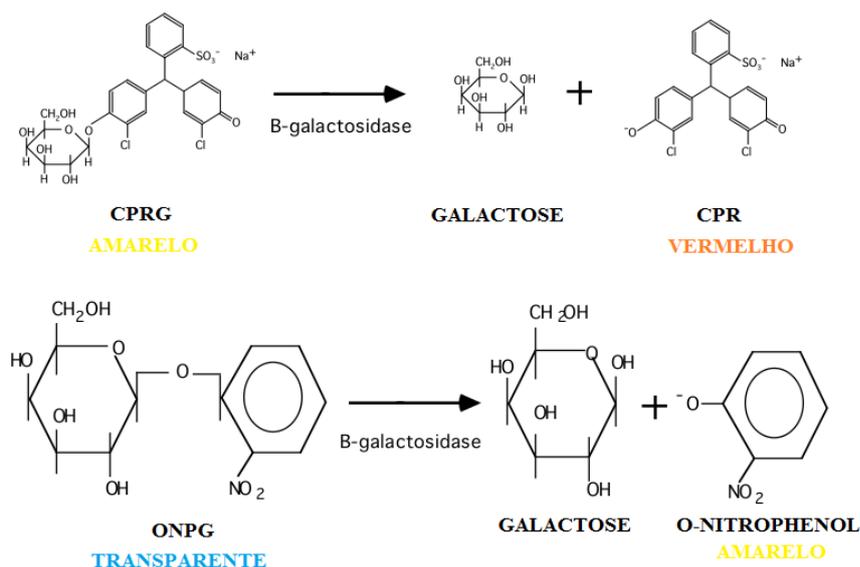
Figura 4: Esquema do sistema de expressão de atividade estrogênica pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* recombinante (ensaio YES).



Legenda: 1) Representa a forma capaz de acoplar-se aos elementos de respostas de estrogênios (ERE); 2) Ativação do receptor; 3) Ligação do estrogênio ao receptor, causando expressão do gene receptor da *Lac-Z*; 4) Produção da enzima β -galactosidase, que é excretada no meio; 5/6) A β -galactosidase metaboliza o substrato cromogênico CPRG (amarelo) em um produto vermelho (que pode ser medido pela absorvância entre 575 a 620 nm).

Fonte: Adaptado de ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996.

Figura 5: Reações de degradação dos substratos cromogênicos CPRG e ONPG pela enzima β -galactosidase.



A mensuração no ensaio YES é colorimétrica, sendo detectada por espectrofotometria. Os resultados obtidos neste ensaio são comparados aos do controle positivo 17 β -estradiol, sendo os resultados expressos em concentração de equivalente 17 β -estradiol (EQ-E₂) (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996).

Sendo um bioensaio *in vitro*, o ensaio YES deve atender alguns requisitos. Como regra geral, para que as curvas dose-resposta das substâncias simples (padrões) possam ser analisadas e comparadas com confiabilidade com a curva padrão do controle positivo. E para que a potência relativa e o valor de CE₅₀ sejam calculados, as curvas devem apresentar um paralelismo (VILLENEUVE et al., 2000; FINNEY, 1965), mesmo que a condição de paralelismo entre as curvas não seja completamente atingida, os resultados de um ensaio comparativo como o YES fornecem indicações preliminares relevantes para a identificação e quantificação de atividade estrogênica (FINNEY, 1965).

No ensaio YES, alguns pontos são relevantes e devem ser destacados, como, por exemplo, o fato de que algumas amostras podem causar um efeito negativo, associado à toxicidade, ou seja, afetam o crescimento da levedura durante o ensaio (lembrando que a *Saccharomyces cerevisiae* cresce durante a incubação das placas de análise), o que pode prejudicar a curva dose-resposta. Isso é muito comum de ocorrer em amostras ambientais, já que essas são complexas e os efeitos sinérgicos dos compostos presentes podem contribuir para essa toxicidade (FRISCHE, et al., 2009). Porém a União Européia (COMPREHEND, 2002), esclarece que essa toxicidade pode ser superada pela diluição dos extratos das amostras.

Substâncias tóxicas podem até mesmo inibir o crescimento da levedura durante a incubação do ensaio, como relatado por Beresford et al. (2000) quando realizaram o ensaio para 4-terc-octifenol e não obtiveram resposta para as quatro maiores concentrações da amostra estudada. A partir de menores concentrações da amostra, observou-se a indução da β -galactosidase, em função da dose. Assim, nas maiores concentrações, essa substância mostrou-se tóxica à levedura, o que pode ocorrer em amostras ambientais dependendo dos compostos presentes.

Beresford et al. (2000) também observaram que essa mesma substância, o 4-terc-octifenol, quando submetida em altas concentrações ao ensaio YES, levou a indicação da ocorrência de contaminação cruzada entre as linhas da placa de 96 poços. As linhas do branco ficaram contaminadas após o período de incubação, o que revela que, em altas concentrações

algumas substâncias volatizam no interior da placa de análise, o que pode levar a falsos positivos no resultado. É importante salientar isso, pois em amostras complexas não é possível saber quais compostos e em quais concentrações eles estão presentes.

A União Européia (COMPREHEND, 2002), destaca que, além da toxicidade, outro fator interferente nos resultados do ensaio YES é a presença dos acetatos de alquilfenóis, os quais suprimem a atividade estrogênica de esteroides e dos próprios alquilfenóis.

Além disso, deve existir muito cuidado na escolha dos reagentes, no preparo das soluções, bem como na utilização de material descartável estéril (placas e ponteiras) e na limpeza e esterilização da vidraria utilizada; pois o ensaio apresenta alta sensibilidade e qualquer fonte de contaminação poderá afetá-lo negativamente.

Ainda existem outras variáveis que podem influenciar no desenvolvimento do ensaio, como, por exemplo, o tempo de incubação, o uso de solventes diferentes do etanol absoluto e o número inicial de células de levedura (BERESFORD et al., 2000).

O tempo de incubação pode interferir nos resultados tanto na curva padrão do controle positivo 17 β -estradiol, quanto nas amostras e no branco. O uso de solventes diferentes do etanol absoluto pode causar toxicidade à levedura presente no ensaio. A variação no número inicial de células, bem como a fase de crescimento em que ela se encontra, pode aumentar ou diminuir a sensibilidade, o que altera o valor do CE_{50} e conseqüentemente de equivalente estradiol (EQ-E₂).

Brix et al., (2010), observaram bons resultados de correlação entre o ensaio YES e análises químicas. Neste sentido, os autores propuseram que o ensaio YES seja utilizado como forma de selecionar quais das amostras estudadas serão submetidas a análises químicas posteriores para uma caracterização mais completa dos compostos nelas presentes. Os autores ainda ressaltam que isto poderia levar a uma redução nos custos com análises laboratoriais, pois em geral o custo do bioensaio é cerca de 8% do custo das análises químicas para cada amostra.

Assim sendo, o ensaio YES mostra-se um aliado para a identificação e quantificação da estrogenicidade de matrizes ambientais. Entretanto é necessário que os fatores que influenciam na resposta do ensaio sejam monitorados. Por ser um ensaio *in vitro*, é importante salientar que a combinação com análises químicas e bioensaios *in vivo* é interessante e considerável para mais completa expressão dos resultados.

2.4.2. Compilação de resultados de autores que utilizaram ensaios com diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, usando receptor de estrogênio como via de sinalização

Existem diversos ensaios que usam o receptor de estrogênio como via de sinalização para a aferição da atividade estrogênica. Esses ensaios utilizam diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes.

A Tabela 4 apresenta uma compilação de resultados de autores, que utilizaram a via de sinalização receptor de estrogênio, para analisar a atividade estrogênica tanto de substâncias simples (padrões) como de amostras provenientes de diversas matrizes ambientais.

Tabela 4: Ensaios com diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, todos usando receptor de estrogênio como via de sinalização.

Substância/Amostra	EQ-E ₂ (ng.L ⁻¹)	CE ₅₀ (ng.L ⁻¹)	Potência Relativa	Referência
17β-Estradiol (E ₂)	-	-	1	(BERESFORD et al., 2000)
	-	-	1	(MURK et al., 2002)
	-	57,2	1	(RUTISHAUSER et al., 2004)
	-	49	1	(BECK et al., 2006)
	-	-	1	(CAJTHAML et al., 2009)
	-	-	1	(BRIX et al., 2010)
	-	39,5	-	(BALSIGER et al., 2010)
	-	54,5	-	(FIC et al., 2014)
17α-Etinilestradiol (EE ₂)	-	-	1,2	(MURK et al., 2002)
	-	53,3	1,19	(RUTISHAUSER et al., 2004)
	-	71,14	1,25	(BECK et al., 2006)
	-	-	1,5	(CAJTHAML et al., 2009)
	-	57,2	-	(BALSIGER et al., 2010)
Estrona (E ₁)	-	-	0,1	(MURK et al., 2002)

(Continua)

Tabela 4: Ensaios com diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, todos usando receptor de estrogênio como via de sinalização (Continuação).

Substância/Amostra	EQ-E ₂ (ng.L ⁻¹)	CE ₅₀ (ng.L ⁻¹)	Potência Relativa	Referência
Estrona (E ₁)	-	148,7	0,38	(RUTISHAUSER et al., 2004)
	-	243,33	0,25	(BECK et al., 2006)
	-	346,07	-	(BALSIGER et al., 2010)
Estriol (E ₃)	-	25665,8	2,4 x 10 ⁻³	(RUTISHAUSER et al., 2004)
	-	6344,36	5,9 x 10 ⁻³	(BECK et al., 2006)
17 α -Estradiol	-	-	0,01	(MURK et al., 2002)
Mestranol (MES)	-	5277,3	1,3 x 10 ⁻²	(RUTISHAUSER et al., 2004)
17 β -Estradiol-valerato (E ₂ - VAL)	-	352,9	0,21	
3-sulfato β -estradiol	-	-	3 x 10 ⁻⁴	(BERESFORD et al., 2000)
	-	-	3 x 10 ⁻²	
	-	-	1 x 10 ⁻¹	
Genisteína	-	270240	1,5 x 10 ⁻⁴	(BECK et al., 2006)
	-	-	1,52x 10 ⁻⁴	(BRIX et al., 2010)
	-	-	8,7 x 10 ⁻⁵	
	-	-	2,2 x 10 ⁻⁴	
	-	-	2,6 x 10 ⁻⁴	
Daidzeína	-	15254400	2,5 x 10 ⁻⁶	(BECK et al., 2006)
Bisfenol-A (BPA)	-	-	1 x 10 ⁻⁴	(BERESFORD et al., 2000)
	-	-	1,0 x 10 ⁻⁵	(MURK et al., 2002)
	-	456580	1,1 x 10 ⁻⁴	(RUTISHAUSER et al., 2004)
	-	342435	1,2 x 10 ⁻⁴	(BECK et al., 2006)
	-	-	\cong 1 x 10 ⁻⁶	(CAJTHAML et al., 2009)
	-	783034,7	-	(BALSIGER et al., 2010)
	-	821844	-	(FIC et al., 2014)
Bisfenol-AF (BPAF)	-	131129,7	-	
Bisfenol-F (BPF)	-	9350774,1	-	
2,4-bis (4-hidroxifenil)-4-metilpent-1-eno (MBP)	-	3757,026	-	
Nonilfenol	-	-	4 x 10 ⁻³	(BERESFORD et al., 2000)
	-	-	3 x 10 ⁻³	
	-	1850,94	2,5 x 10 ⁻⁵	(RUTISHAUSER et al., 2004)
	-	1542450	1,8 x 10 ⁻⁵	(BECK et al., 2006)

(Continua)

Tabela 4: Ensaio com diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, todos usando receptor de estrogênio como via de sinalização (Continuação).

Substância/Amostra	EQ-E ₂ (ng.L ⁻¹)	CE ₅₀ (ng.L ⁻¹)	Potência Relativa	Referência
Nonilfenol	-	-	1,3 x 10 ⁻⁵	(BRIX et al., 2010)
	-	-	3,3 x 10 ⁻⁶	
	-	5464,68	-	(BALSIGER et al., 2010)
Octilfenol	-	5570,64	7,8 x 10 ⁻⁶	(RUTISHAUSER et al., 2004)
4-Terc- Octilfenol	-	6395920	4,5 x 10 ⁻⁶	(BECK et al., 2006)
Dimetilftalato	-	-	1,0 x 10 ⁻⁶	(MURK et al., 2002)
Dietilftalato	-	-	5,0 x 10 ⁻⁷	
Di-n-butilftalato	-	-	1,0 x 10 ⁻⁷	
Benzilbutilftalato	-	-	1,0 x 10 ⁻⁶	
Di-(2-etil hexil) ftalato	-	-	0	
Diocilftalato	-	-	0	
Nonilfenol etoxilado	-	-	4,0 x 10 ⁻⁶	
Octilfenol etoxilado	-	-	4,0 x 10 ⁻⁶	
4-Nonilfenol	-	-	5,7 x 10 ⁻⁴	
4-Octilfenol	-	-	1,0 x 10 ⁻⁵	
Butilfenol	-	-	1 x 10 ⁻⁶	
4-Onilfenol	-	-	≅ 1 x 10 ⁻⁶	(CAJTHAML et al., 2009)
4-Nonilfenol	-	-	≅ 1 x 10 ⁻⁶	
Triclosano	-	-	≅ 1 x 10 ⁻⁶	
DHT	-	-	4 x 10 ⁻³	(BERESFORD et al., 2000)
HPTE	-	-	8 x 10 ⁻³	
Metoxicloro	-	-	8 x 10 ⁻⁴	
Água residual (Países Baixos)	0 – 86,35	-	-	(MURK et al., 2002)
Água superficial (Países Baixos)	0 – 1,09	-	-	
Efluentes de instalações de águas residuais municipais da América do Norte	≤1 – 15	-	-	(HUGGET et al., 2003)
ETE (Suíça)	0,5 – 100	-	-	(RUTISHAUSER et al., 2004)
Água superficial (Alemanha)	11,97 – 19,42	-	-	(PAWLOWSKI et al., 2004)
ETEs (Alemanha)	34,1 – 65,96	-	-	(PAWLOWSKI et al., 2004)
Água superficial à montante e jusante de fazendas pecuárias (Reino Unido)	0,06 – 292	-	-	(MATTHIESSEN et al., 2006)
Água superficial (Mar Báltico)	0,01 – 0,82	-	-	(BECK et al., 2006)

(Continua)

Tabela 4: Ensaios com diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, todos usando receptor de estrogênio como via de sinalização (Continuação).

Substância/Amostra	EQ-E ₂ (ng.L ⁻¹)	CE ₅₀ (ng.L ⁻¹)	Potência Relativa	Referência
Sedimento de rio (Itália)	15,6 *	-	-	(VIGANÒ et al., 2008)
Estação de tratamento de águas residuais (El Paso, Texas, EUA)	0 – 28,4	-	-	(BALSIGER et al., 2010)
Água superficial (São Paulo, Brasil)	0,13 – 3,1	-	-	(JARDIM et al., 2012)
ETE (Canadá)	≤1 – 4,5	-	-	(METCALFE et al., 2013)
Água potável – torneira (China)	0,0352 – 1,511	-	-	(ZENG et al., 2013)
Águas residuais (Zhengzhou, China)	1228,5 – 1691,54	-	-	(LI et al., 2015)
Lodo biológico de esgoto (China)	2,8 – 4,7 *	-	-	(RUAN et al., 2015)
Água superficial (Rio Guandu – Rio De Janeiro) (filtrado na membrana 1,2 µm)	0 – 16	-	-	(DIAS et al., 2015)
Água superficial (Rio Guandu – Rio De Janeiro) (filtrado na membrana 0,45 µm)	0 – 3,1	-	-	

(-) Não informado

(*) ng.g

É notório que existe uma grande quantidade de trabalhos que analisaram a estrogenicidade de substâncias padrões, porém poucos são os estudos com amostras ambientais, isso devido à dificuldade de se trabalhar com amostras complexas.

Dois fatores interferentes nos resultados do ensaio são a toxicidade e a presença dos acetatos de alquilfenóis, os quais suprimem a atividade estrogênica de esteroides e dos próprios alquilfenóis (COMPREHEND, 2002). Esses problemas são, muitas vezes, recorrentes, em amostras provenientes de matrizes ambientais, o que dificulta a consolidação dos resultados do ensaio YES para essas amostras.

No que tange aos resultados do ensaio YES para substâncias padrões, vale ainda ressaltar que a PR não é um valor universal relacionado ao controle positivo 17β-estradiol, mas também é relativo ao ensaio específico e ao uso do ensaio pelo laboratório (BRIX et al., 2010), pois esses fatores podem interferir no valor de CE₅₀.

Isso explica os diferentes valores de PR, encontrados por Beresford et al. (2000) para a mesma substância (3-sulfato β -estradiol e nonilfenol), pois não houve uma constância na metodologia do ensaio, já que em seu estudo, foram realizados diversos testes com diferentes variáveis que podem influenciar no desenvolvimento do ensaio, como, por exemplo, o tempo de incubação, o uso de solventes diferentes do etanol absoluto e o número inicial de células de levedura.

Por isso a importância e necessidade da reprodutibilidade do ensaio, a qual é essencial para a validação dos resultados. Partindo do princípio de que não foram observadas significativas diferenças entre os resultados dos demais autores para PR pode-se dizer que os ensaios que utilizam receptor de estrogênio como via de sinalização são, além de sensíveis, reprodutivos.

2.5. Ensaios de toxicidade com amostras ambientais

Segundo Arenzon et al. (2011), a toxicidade refere-se à capacidade de determinada substância, produto ou conjunto de substâncias provocarem efeitos danosos aos organismos com os quais entram em contato. Estes efeitos podem ser desde alterações comportamentais, alteração de crescimento ou reprodução até mesmo a morte dos organismos.

Os efeitos nocivos desencadeados por DEs no meio ambiente atingem desde microinvertebrados até grandes vertebrados, sendo amplamente relatados na literatura científica, conforme citado na Tabela 2.

A toxicologia estuda esses efeitos nocivos causados nos seres vivos através da toxicidade aguda e/ou crônica. A toxicidade aguda mede os efeitos de agentes tóxicos sobre espécies durante um curto período de tempo em relação ao período de vida do organismo-teste. Já a toxicidade crônica mede os efeitos de substâncias químicas sobre espécies por um período que pode abranger parte ou todo o ciclo de vida do organismo-teste. Em síntese, a toxicidade é a capacidade inerente de determinada substância química e/ou de seus metabólitos produzirem um efeito tóxico.

O objetivo dos ensaios de toxicidade é simular, em laboratório, os efeitos que poderiam ser observados nos organismos presentes no meio ambiente (ARENZON et al., 2011).

No geral, os organismos que podem ser utilizados nos ensaios são de quatro níveis tróficos: os organismos produtores (algas), os consumidores primários (micro crustáceos), os consumidores secundários (peixes) e os decompositores (bactérias). Esses organismos são chamados de organismos-teste e são espécies mantidas em laboratório e cujos conhecimentos de sua biologia são suficientes para que possam ser utilizados como indicadores da toxicidade. Tanto a forma de cultivo como as metodologias de ensaio para estes organismos são definidas em normas técnicas validadas, permitindo a reprodutibilidade dos resultados.

O Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução CONAMA nº 430 (Brasil, 2011), regula o lançamento de efluentes líquidos e exige que sejam realizados ensaios de toxicidade com pelo menos dois organismos de diferentes níveis tróficos.

O estágio de desenvolvimento do organismo em que ocorre a exposição aos DEs é particularmente importante. Pesquisas demonstram que os DEs podem apresentar maiores riscos à saúde durante os períodos críticos da vida (intrauterino, perinatal, juvenil ou puberdade) quando os sistemas reprodutivo, imunológico e nervoso estão em formação e desenvolvimento (FRYE et al., 2012). Assim, a principal preocupação ecotoxicológica com os DEs implica em sua evidente capacidade de afetar a reprodução das espécies e interferir no desenvolvimento da prole.

2.6. Remoção de desreguladores endócrinos em plantas de tratamento de água

Conforme já citado anteriormente, os DEs incluem uma série de hormônios esteroides, sejam naturais ou sintéticos, além de uma série de substâncias químicas e esses compostos estão presentes nos efluentes descartados em rios e águas superficiais, principalmente por esgoto doméstico e industrial.

A remoção de DEs em estações de tratamento é considerada incompleta, pois tratamentos convencionais são ineficientes para a remoção desses compostos (LEECH et al.,

2009; LIU et al., 2009) o que ocasiona sérios danos à saúde dos seres vivos, mesmo que esses DEs se encontrem em baixas concentrações.

Segundo a Comissão Européia (CEC, 2014), com base em dados obtidos na literatura, os processos considerados eficazes para a remoção ou oxidação de compostos com atividade estrogênica são: dióxido de cloro (oxidação de 97% a 99%), ozônio (oxidação > 95%), irradiação ultravioleta com dióxido de titânio (oxidação de até 99%), irradiação ultravioleta juntamente com peróxido de hidrogênio (oxidação > 99%), separação por membrana utilizando nanofiltração (remoção de até 99 %), carvão ativado em pó (remoção de 50% a 99%) e cloro (oxidação de cerca de 50 %).

A remoção desses contaminantes deveria ser realizada antes do lançamento do efluente no meio ambiente a fim de eliminar ou ao menos reduzir os riscos ocasionados por esses DEs. Porém, isso está fora da nossa realidade atual, dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010) revelam que dos 1668 municípios da região sudeste, 1.586 têm sistemas de coleta de esgotos em operação, no entanto, apenas 808 municípios têm instalações de tratamento de esgotos e o tratamento de águas residuais a nível secundário (biológico) só é realizado em 461 municípios. Sendo assim, em muitas localidades o esgoto atinge os sistemas aquáticos sem qualquer tipo de tratamento ou quando é tratado, este é um tratamento precário.

Vale destacar que com a ausência de tratamento adequado para efluentes lançados em corpos hídricos, incluindo rios responsáveis pelo abastecimento de água, até mesmo o provimento de água potável fica comprometido em relação à contaminação por DEs, visto que o tratamento convencional não é eficiente para a remoção desses compostos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Descrição das áreas de estudo

O presente estudo foi realizado em duas áreas de estudo diferentes: Rio Guandu, localizado no Rio de Janeiro, Brasil e Rio Santa Lucía localizado ao sul do Uruguai.

3.1.1. Rio Guandu

A bacia hidrográfica do Rio Guandu é formada pelos rios Guandu, da Guarda e Guandu-Mirim, está situada a oeste da bacia da Baía de Guanabara, contribuindo à Baía de Sepetiba, no Estado do Rio de Janeiro, e ocupa uma área de 3.600 km², abrangendo 15 municípios: Seropédica, Itaguaí, Paracambi, Japeri, Queimados, Miguel Pereira, Vassouras, Piraí, Rio Claro, Engenheiro Paulo de Frontin, Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Mendes, Mangaratiba e Barra do Piraí (Figura 6).

O rio Guandu, principal curso d'água da bacia da baía de Sepetiba, drena uma bacia com área de 1.385 Km². É formado pelo ribeirão das Lajes que passa a se chamar rio Guandu a partir da confluência com o rio Santana. Tem como principais afluentes, os rios dos Macacos, Santana, São Pedro, Poços/Queimados e Ipiranga. O seu curso final retificado leva o nome de canal de São Francisco. Todo o seu percurso até a foz (Ribeirão das Lajes – Guandu – canal de São Francisco), totaliza 48 Km (Figura 7).

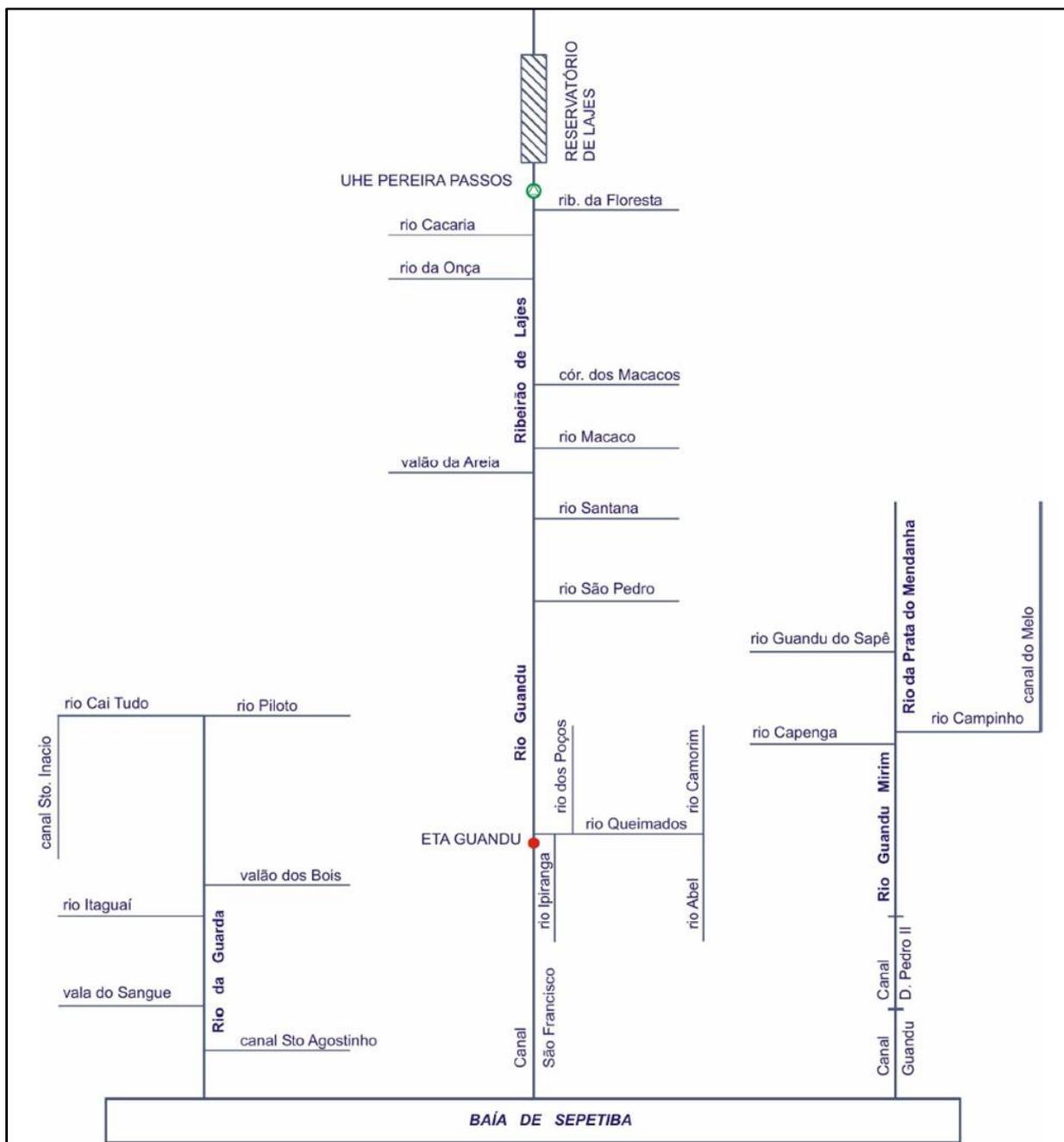
Atualmente, o Rio Guandu é a principal fonte de abastecimento da região metropolitana do Rio de Janeiro. Apesar da importância do manancial, esse rio é afetado, por graves problemas ambientais devido à poluição oriunda de seus afluentes, dos esgotos domésticos e industriais lançados, além de efluentes de práticas agropecuárias (SEMADS, 2001).

Figura 6: Bacia hidrográfica do Rio Guandu.



Fonte: <http://www.comiteguandu.org.br/> acesso em dezembro/2014.

Figura 7: Rio Guandu e seus principais afluentes.



Fonte: <http://www.comiteguandu.org.br/> acesso em dezembro/2014.

As coletas das amostras de água foram realizadas em dois pontos. Um ponto antes da estação de tratamento de água (ETA) Gandu, próximo ao local de captação de água da ETA (22°48'27"S; 43°37'36"O) (Figura 8) e outro ponto após a ETA. Como não foi possível coletar exatamente na saída da ETA, foi realizada a coleta de água da torneira em um

estabelecimento que se situa próximo a ETA Guandu e recebe água potável dessa ETA, esse ponto fica localizado nas coordenadas geográficas: 22°50'46"S; 43°36'22"O. As amostras, de água bruta e potável, foram coletadas duas vezes por mês durante 5 meses, de setembro de 2014 a janeiro de 2015, totalizando 10 campanhas e 20 amostras (sendo 10 de água bruta e 10 de água potável).

Figura 8: Local de coleta de água bruta no Rio Guandu.



Para a identificação das amostras, foram utilizados os códigos conforme mostra a Tabela 5. Onde elas foram numeradas de acordo com a data da coleta e discriminadas pela letra A para as amostras água bruta e pela letra B para as de água potável.

Tabela 5: Código das amostras do Rio Guandu com localização e data de coleta.

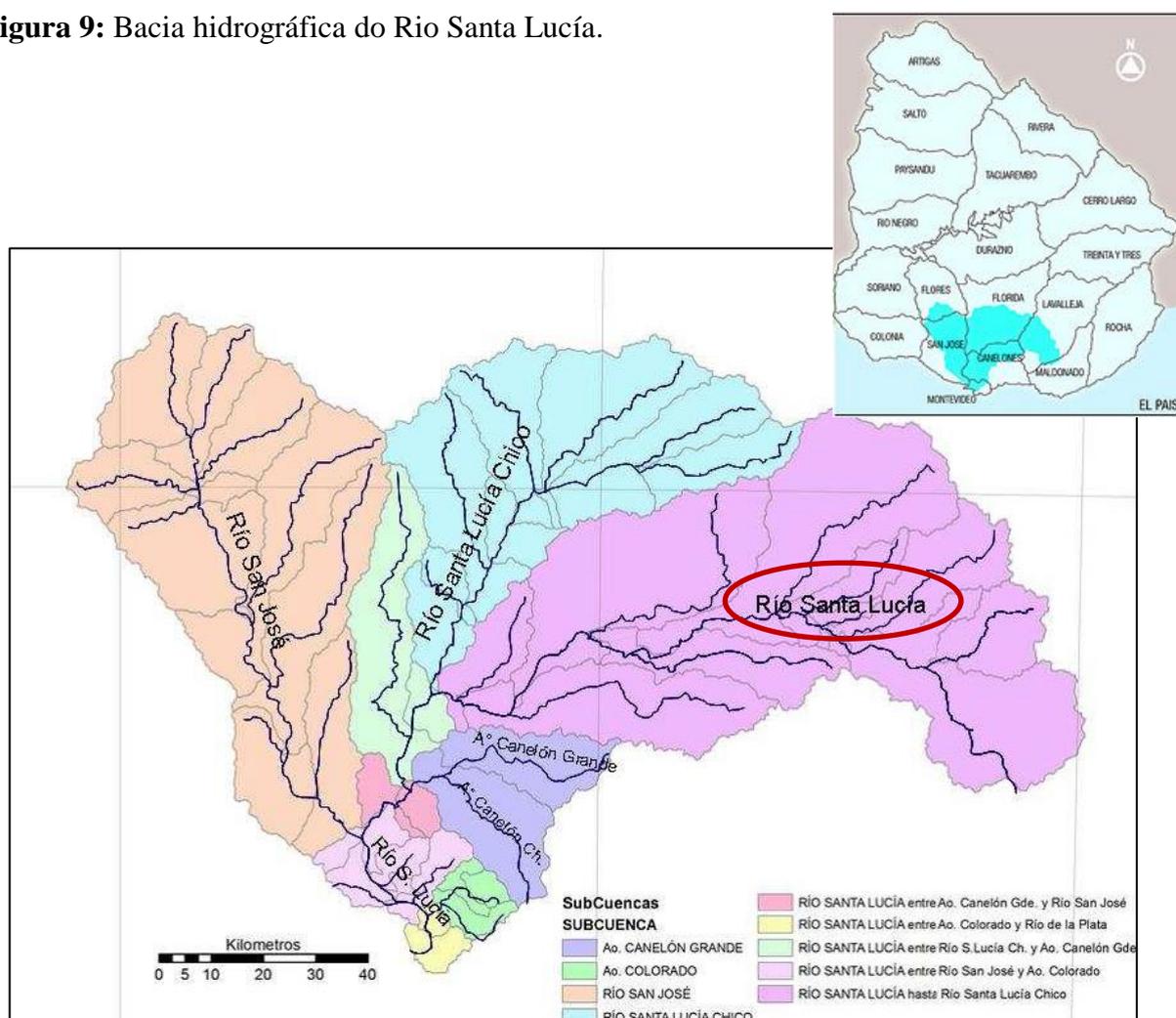
Água bruta	Água potável	Data de coleta
1A	1B	10/09/2014
2A	2B	24/09/2014
3A	3B	09/10/2014
4A	4B	31/10/2014
5A	5B	14/11/2014
6A	6B	27/11/2014
7A	7B	15/12/2014
8A	8B	30/12/2014
9A	9B	15/01/2015
10A	10B	26/01/2015

3.1.2. Rio Santa Lucía

O Rio Santa Lucía faz parte da bacia Santa Lucía que está localizada ao sul do Uruguai (Figura 9) e compreende uma área de 13448 km². Os três maiores rios dessa bacia são: San José a Oeste, Santa Lucía Chico ao centro, Santa Lucía ao Leste.

Essa bacia fornece abastecimento de água potável para mais de 60% dos uruguaios. Os principais usos das redondezas dessa bacia são: pecuária (71,3%), agrícola (16,2%), florestal (4,2%) e por último urbano-industrial (1,1%) (ACHKAR et al., 2004).

Figura 9: Bacia hidrográfica do Rio Santa Lucía.



Fonte: Adaptado de INDA e INDARTE, 2009.

Foram realizadas coletas, de amostras de água bruta e sedimento, mensais durante 3 meses (dezembro de 2014 a fevereiro de 2015) em 3 canais do Rio Santa Lucía, chamados: Campanero Chico ($34^{\circ}22'8''\text{S}$; $55^{\circ}11'40''\text{O}$), Arequita ($34^{\circ}17'7''\text{S}$; $55^{\circ}17'6''\text{O}$) e San Francisco ($34^{\circ}21'17''\text{S}$; $55^{\circ}15'27''\text{O}$) (Figura 10). Os três pontos de coleta localizam-se no departamento de Lavalleja, na cidade de Minas.

As amostras foram coletadas em triplicatas em cada ponto. Totalizando 54 amostras coletadas em três campanhas, sendo 27 amostras de água superficial e 27 de sedimento.

Figura 10: Pontos de coleta no Rio Santa Lucía



Como os resultados das triplicatas não destoaram, usou-se então como resultado final as médias das triplicatas com os desvios e para a identificação foram utilizados os códigos apresentados na Tabela 6, onde se utilizou a letra D para as amostras coletadas em dezembro, J para as de janeiro e F para as de Fevereiro, seguidas da letra A para amostras de água ou S para de sedimento. Acompanhada do numero 1 para o ponto Campanero Chico, 2 para o Arequita e 3 para o San Francisco.

Tabela 6: Código das médias das triplicatas das amostras do Rio Santa Lucía

Localização	Ponto	Água	Sedimento	Mês de coleta
Campanero Chico	1	DA1	DS1	Dezembro
		JA1	JS1	Janeiro
		FA1	FS1	Fevereiro
Arequita	2	DA2	DS2	Dezembro
		JA2	JS2	Janeiro
		FA2	FS2	Fevereiro
San Francisco	3	DA3	DS3	Dezembro
		JA3	JS3	Janeiro
		FA3	FS3	Fevereiro

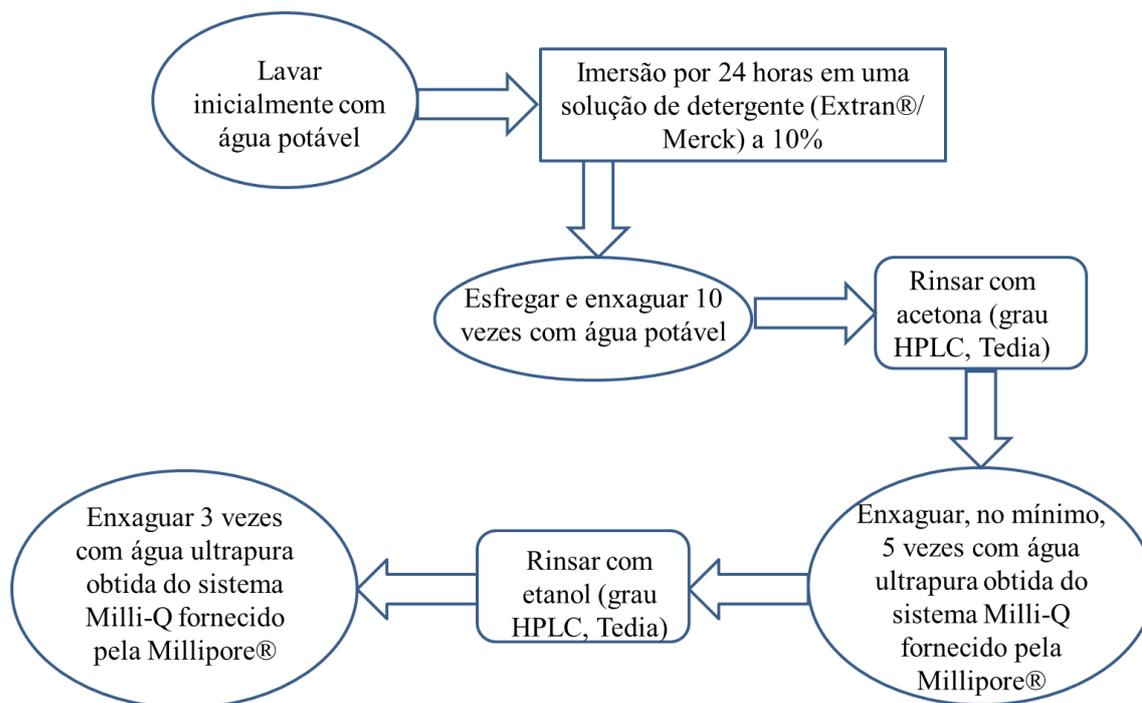
3.2. Preparo das amostras coletadas para o ensaio *in vitro* YES e para a cromatografia

3.2.1. Limpeza das vidrarias

O ensaio *in vitro* YES e a cromatografia, por analisarem micropoluentes, requerem procedimentos cuidadosos de limpeza e descontaminação de vidraria. Pois como esses contaminantes são encontrados em níveis traços é necessário o máximo de cuidado possível para evitar a contaminação do material utilizado, o que prejudicaria a acurácia dos resultados nas análises. Com isso foram adotado um protocolo de limpeza (Figura 11) e armazenamento de vidraria a fim de garantir a integridade dos resultados.

Todas as vidrarias, depois de descontaminadas e secas, foram envoltas em papel alumínio e guardadas em ambiente limpo para impedir futura contaminação.

Figura 11: Fluxograma do protocolo de limpeza e descontaminação de vidrarias.

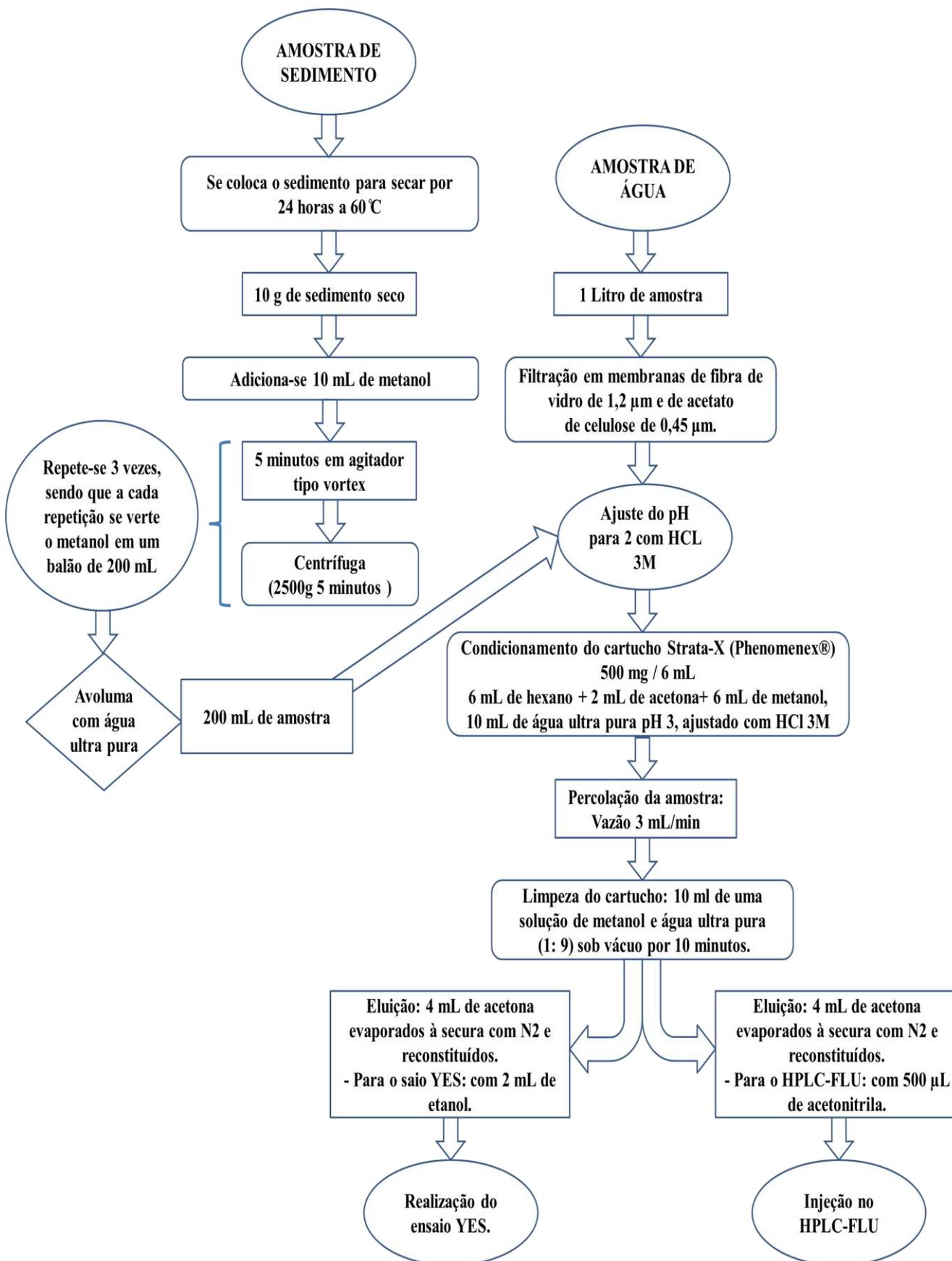


3.2.2. Coleta e armazenamento das amostras

Todas as amostras, tanto de água como de sedimento, foram coletadas em frasco de vidro âmbar. Nos frascos contendo as amostras de água foi adicionado metanol (grau HPLC, Tedia®) na proporção de 1% v/v de amostra (10 mL para cada 1 L de amostra coletada) a fim de evitar a degradação microbiológica dos compostos de interesse. Os frascos, contendo as amostras de água e sedimento, foram devidamente armazenados em isopor com gelo, transportados e mantidos a temperatura inferior a 6 °C no laboratório, para futura realização das análises.

As amostras foram devidamente preparadas, de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 12 e com base nos procedimentos descritos a seguir, preferencialmente no dia da coleta ou, caso não fosse possível, em, no máximo, quarenta e oito horas após a coleta. Nesse caso, as amostras foram mantidas na geladeira e só foram retiradas cerca de duas horas antes do início dos procedimentos para que atingissem a temperatura ambiente.

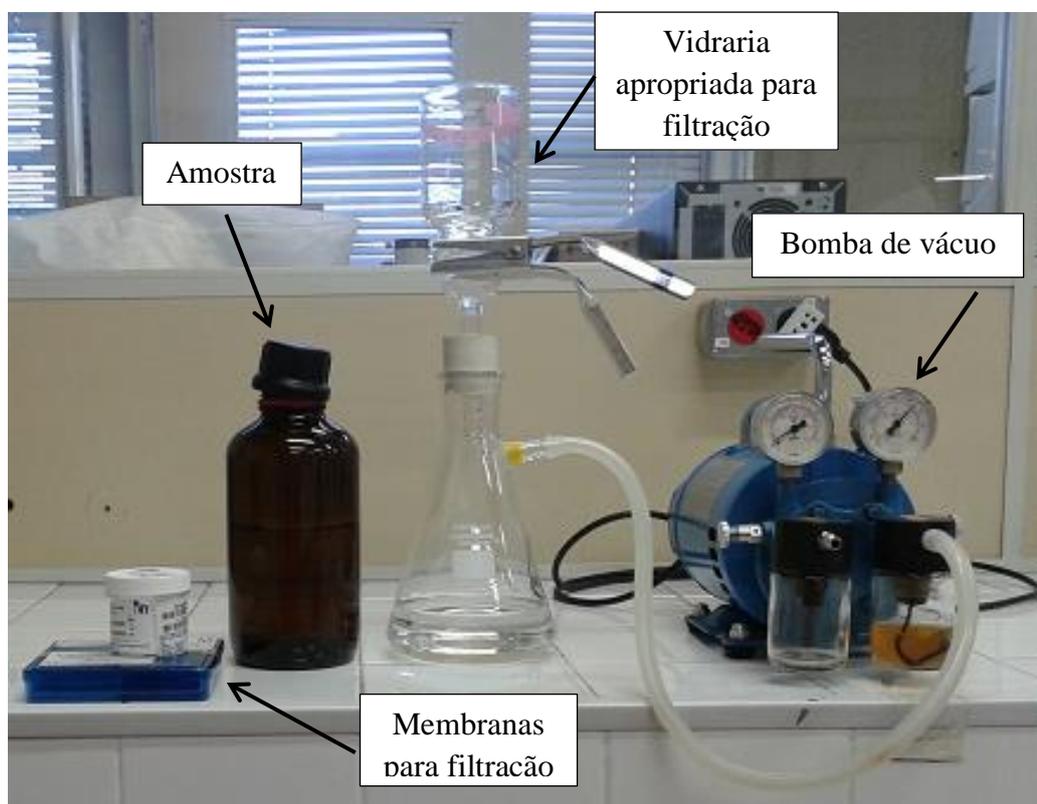
Figura 12: Esquema detalhado das etapas de preparo das amostras até o extrato final usado no ensaio YES e na análise de CLAE.



3.2.3. Primeira parte do processo de preparo das amostras de água: Filtração

Em laboratório, as amostras de água foram filtradas em temperatura ambiente, em filtros de membranas de fibra de vidro de 1,2 μm (Merck) e posteriormente em membranas de acetato de celulose de 0,45 μm (Merck). Os aparatos da filtração estão apresentados na Figura 13. A cada filtração, ao retornar a amostra para o vidro âmbar, este foi previamente rinsado com a própria amostra filtrada para garantir a ausência de resíduo sólido da amostra no vidro. Foi separado 1L de amostra em cada frasco âmbar para a EFS em 1 cartucho.

Figura 13: Foto dos aparatos de filtração.



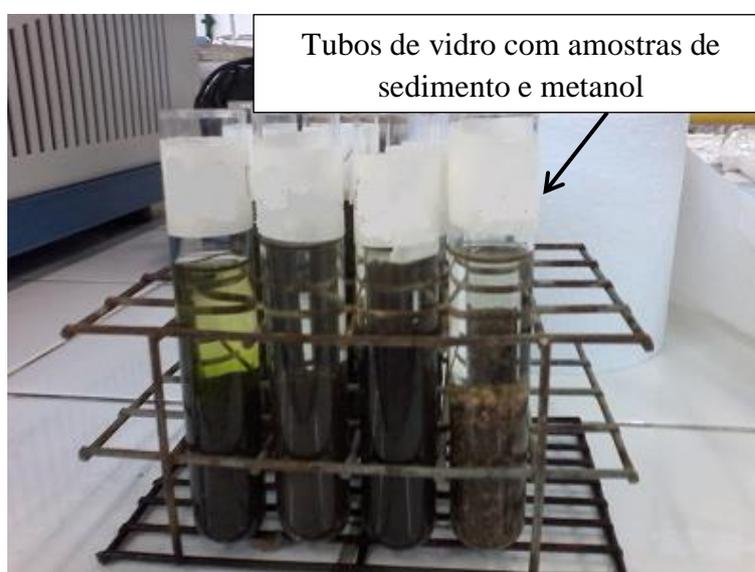
O pH das amostras foi ajustado para 2 com solução de ácido clorídrico (HCl) 3M (grau P.A. Merck). A verificação do pH foi realizada com tira indicadora universal de pH (Merck). Não foi utilizado nenhum equipamento para medir o pH, a fim de impedir contaminação pelo eletrodo, o qual é utilizado em amostras de diversas naturezas.

3.2.4. Primeira parte do processo de preparo das amostras de sedimento

A primeira parte do preparo das amostras de sedimento é diferente do processo de preparo das amostras de água. Pois é preciso retirar os compostos de interesse que estão retidos no sedimento e passá-los para o meio líquido.

Sendo assim, inicialmente o sedimento foi seco por 24 horas à 60 °C em seguida foi pesado 10 gramas de sedimento seco, este foi colocado em um tubo de vidro (Figura 14), ao qual foi adicionado 10 mL de metanol. O material foi submetido a um agitador tipo vortex por 5 minutos, em seguida foi centrifugado a 2500 g por 5 minutos. Desse modo, os compostos de interesse ficavam retidos no metanol, o qual, após a centrifugação, era facilmente vertido para um recipiente volumétrico: balão. Essa parte de adição de metanol, submissão à agitação, centrifugação e separação do meio líquido (metanol com os compostos de interesse) foi repetida por três vezes. Após esse processo, o balão contendo o meio líquido foi avolumado com água ultrapura para 200 mL. Desse modo a amostra de sedimento foi transformada em 200 mL de amostra líquida, o pH foi ajustado para 2, seguindo os mesmos passos da amostra de água. E partir daí pode-se seguir, tanto para as amostras de água como de sedimento, o mesmo protocolo de extração em fase sólida.

Figura 14: Foto dos tubos de vidro utilizados no preparo das amostras de sedimento para posterior realização da EFS.



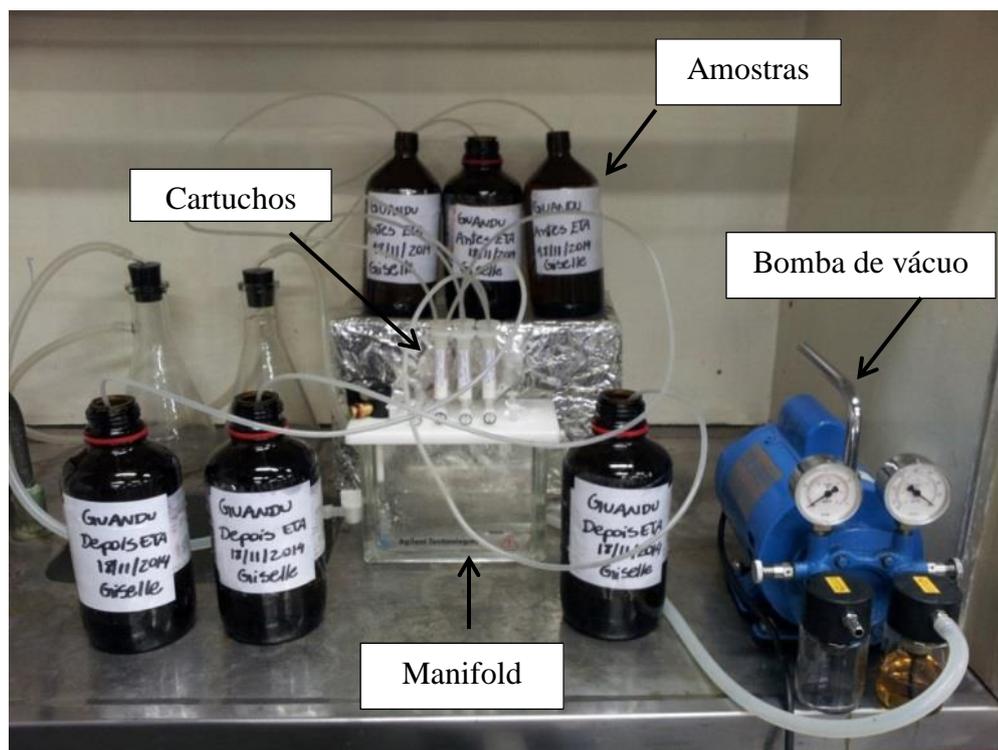
3.2.5. Extração em fase sólida (EFS)

A EFS é uma ferramenta útil para extração e concentração de micropoluentes em amostras aquosas. Para a extração em fase sólida utilizou-se o cartucho Strata-X (Phenomenex[®]) de 500 mg / 6 mL. Estes foram condicionados com 6 mL de hexano, 2 mL de acetona, 6 mL de metanol (grau HPLC, Tedia[®]) e 10 mL de água ultrapura com pH ajustado para 3, com solução de HCl 3M. As amostras foram percoladas nos cartuchos sob vácuo, com vazão aproximada de 3mL.min, sempre tomando o cuidado para que a fase sólida do cartucho não ficasse seca, mantendo uma película de líquido acima da fase a fim de evitar ressecamento dos poros e consequente perda do analito.

A metodologia de EFS utilizada foi descrita por Cordeiro (2009). Esta metodologia apresentou uma boa recuperação para o analito de interesse: 17 α -etinilestradiol.

A extração foi realizada em Manifold (Agilent (VacElut 12)), em capela e foi utilizado um cartucho para cada amostra (1L). A Figura 15 mostra o aparato utilizado nas EFS.

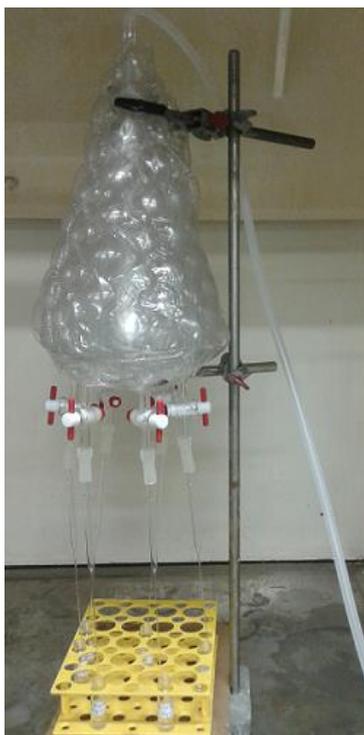
Figura 15: Foto do aparato utilizado na EFS.



No cartucho, após a percolação das amostras, foi realizada a etapa de *clean up*, sendo lavado com 10 ml de uma solução de metanol e água ultrapura (1: 9), para que os possíveis interferentes fossem removidos. Após isso foi mantido sob vácuo por 10 minutos para a remoção do excesso de água. Em seguida, os cartuchos foram armazenados em freezer (com temperatura de -20 °C) até o momento da eluição.

Os analitos foram eluídos dos cartuchos com 4 mL de acetona (grau HPLC, Tedia[®]), sob efeito da gravidade, e acondicionados em frascos de vidro (volume de 10 mL) utilizando o sistema manifold sem o vácuo. Depois, ligou-se a bomba de vácuo por 5 minutos para completa secagem dos cartuchos. Os extratos das amostras foram evaporados à secura com fluxo de nitrogênio gasoso (Figura 16) e reconstituídos com 2 mL de etanol (grau HPLC, Tedia[®]), para a realização do ensaio YES ou com 500 µL de acetonitrila (grau HPLC, Tedia[®]), para a cromatografia. Após a reconstituição dos analitos procedeu-se as análises imediatamente.

Figura 16: Foto do aparato utilizado na secagem das amostras com fluxo de nitrogênio.



3.3. Ensaio *in vitro* YES

3.3.1. Reagentes

Fosfato de potássio monobásico, sulfato de amônio, hidróxido de potássio, sulfato de magnésio, sulfato de ferro, L-leucina, L-histidina, adenina, L-arginina-HCL, L-metionina, L-tirosina, L-isoleucina, L-lisina-HCl, L-fenilalanina, ácido glutâmico, L-valina, L-serina, glicose, ácido L-aspártico, L-treonina, sulfato de cobre (II), tiamina, piridoxina, pantetonato de cálcio, inositol, biotina e CPRG. Todos obtidos da Sigma-Aldrich®.

3.3.2. Preparo das soluções do ensaio YES

O protocolo utilizado para a determinação da atividade estrogênica foi desenvolvido por Routledge e Sumpter (1996), seguindo as orientações e adaptações de Bila (2005), sendo realizadas pequenas modificações no cultivo da cepa *Saccharomyces cerevisiae*.

Todo o material utilizado no preparo das soluções foi previamente limpo de acordo com o tópico limpeza das vidrarias (3.2.1.) citado anteriormente. Lembrando que a vidraria utilizada foi dedicada exclusivamente ao ensaio YES para evitar possíveis interferências ou contaminações.

Impurezas ou contaminações podem causar falsos positivos no ensaio YES, por isso todos os reagentes, água e materiais utilizados na manipulação das soluções do ensaio devem, obrigatoriamente, ter alto grau de pureza. Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma Aldrich® e foram utilizados somente para esse ensaio.

Para o preparo das soluções, os reagentes foram pesados em Becker de 50 mL destinados somente para este fim e após a esterilização as soluções somente foram abertas em capela de fluxo laminar.

O preparo das soluções (Meio Mínimo, Glicose, Ácido L-aspártico, L-treonina, Sulfato de Cobre, Vitamina, CPRG e Meio de Cultivo) encontra-se disponível no ANEXO 1.

3.3.3. Cultivo da cepa *Saccharomyces cerevisiae*

O ensaio YES utiliza a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A cepa foi construída por técnicas de engenharia genética e encontra-se disponibilizada pela Glaxo Group Research (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996). A cepa utilizada no processo de transformação foi a BJ1991 (BISTAN et al., 2012). A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante utilizada foi gentilmente cedida pela professora Marcia Dezotti (UFRJ).

O preparo da cepa foi sempre realizado em capela de fluxo laminar seguindo o protocolo apresentado por Routledge e Sumpter (1996) com algumas modificações.

3.3.3.1. Congelamento

O congelamento foi sempre realizado ao término de cada ensaio com as células que restavam do inóculo utilizado, para garantir que a levedura fosse congelada fresca. Em tubo criogênico estéril, volume de 2 mL, foi colocado a levedura e adicionado o glicerol previamente esterilizado a 121°C por 15 minutos, na proporção de 40% (900 µL de células em meio de cultivo e 600 µL de glicerol estéril). Os tubos criogênicos foram armazenados em freezer a temperatura de - 20 °C, onde podem ser mantidos por até 1 ano e também a temperatura de -80 °C, podendo ser guardados por mais tempo, no prazo máximo de 5 anos.

3.3.3.2. Descongelamento, pré-inóculo e inóculo

Previamente à realização dos ensaios (48 horas antes), a cepa foi descongelada e foi realizado o pré- inóculo. Todas as células contidas no tubo criogênico foram ressuspensa em 10 mL de meio de cultivo em um frasco de cultivo novo e estéril. Os frascos de cultivo foram incubados a 28 °C por 24 horas sob agitação de 150 rpm, em incubadora de bancada com agitação orbital (Marca Quimis, modelo Q816M20).

Em seguida, foi realizado o inóculo, adicionando-se 100 µL da cultura do pré-inóculo à um novo frasco de cultivo estéril contendo 10 mL de meio de cultivo, sendo novamente

incubado sob as mesmas condições do pré-inóculo, por 24 horas, e assim, a cepa estava pronta para ser utilizada no ensaio.

3.3.4. Preparo do meio de análise para o ensaio YES

O preparo do meio de análise para o ensaio foi realizado em tubos do tipo falcon, estéreis ou, dependendo da quantidade necessária, em frascos de vidro previamente esterilizados a 121 °C por 15 minutos e destinados somente para esse fim. Inicialmente é necessário preparar o meio com a levedura para em seguida preparar o meio de análise. Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar. O preparo seguiu o roteiro apresentado a seguir.

3.3.4.1. Preparo do meio com a cultura de levedura

Em um tubo falcon estéril de 50 mL foram adicionados 4 mL do meio de cultivo e 3 mL do cultivo da levedura (cultivo realizado conforme apresentado no item 3.3.3. Leu-se então a absorbância a 620 nm desta cultura. O procedimento foi definido conforme a faixa de absorbância atingida:

- Absorbância 0,8 a 1,0: faixa boa, cultura pronta para o uso.
- Absorbância inferior a 0,8: adicionar pequenos volumes de levedura até atingir a absorbância de 0,8.
- Absorbância superior a 1,0: adicionar pequenos volumes de meio de cultivo até atingir a faixa entre 0,8 a 1,0.

Vale destacar que este procedimento foi inteiramente realizado em capela de fluxo laminar. Uma vez que a cultura foi retirada da capela para a leitura de sua absorbância, esta não foi mais utilizada.

Este procedimento é uma adaptação do método original de Routledge e Sumpter (1996) para facilitar a etapa de contagem das células de levedura, a qual era feita em microscópio, e tem sido adotado com sucesso em diversas pesquisas, como Bistan et al. (2012) e Frische et al. (2009).

3.3.4.2. Preparo do meio de análise

Em um tubo Falcon de 50 mL foram adicionados 25 mL do meio de cultivo, 250 μL de solução de CPRG e 25 μL do meio com a cultura de levedura. Lembrando que esse é o protocolo para a realização do ensaio com 2 amostras em duplicata com seus respectivos controles negativos (brancos), ou seja, uma placa de 96 poços.

3.3.5. Procedimento do ensaio YES

O procedimento de análise foi desenvolvido de acordo com a metodologia de Routledge e Sumpter (1996) e Bila (2005), com algumas modificações. As análises foram realizadas em microplacas de 96 poços para cultura, com fundo chato e tampa estéril, e foram preparadas em uma capela de fluxo laminar. As amostras foram avaliadas em duplicatas.

Todo o material utilizado para manuseio e armazenamento de soluções durante a execução do ensaio foi previamente esterilizado. As ponteiros utilizadas foram sempre novas e estéreis. E utilizaram-se pipetas graduadas estéreis e descartáveis.

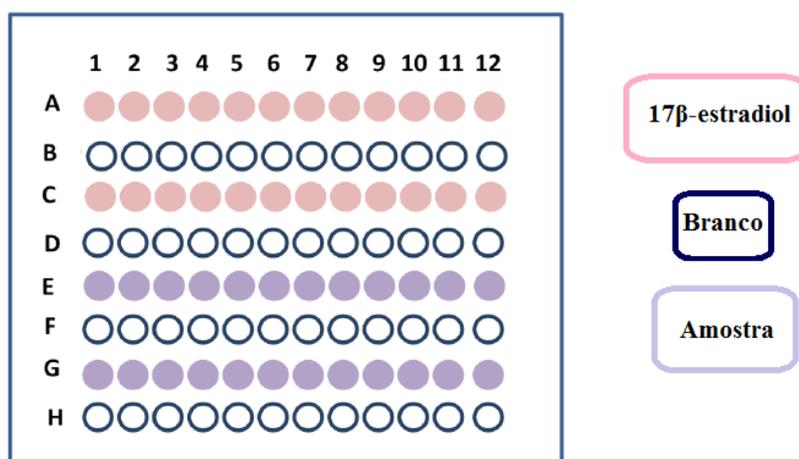
Para a realização do ensaio primeiramente é feito a diluição dos extratos de amostras obtidos na EFS. A concentração da amostra realizada na EFS e a diluição dos extratos das amostras efetuada no ensaio são executadas a fim de garantir que as concentrações da amostra estarão dentro da curva do controle positivo, para que futuramente possa ser calculada a atividade estrogênica. O preparo das diluições foi realizado em uma placa de 96 poços, dedicada a esta finalidade. Os extratos das amostras foram diluídos na proporção 1:2, seguindo o roteiro:

- Adicionar 100 μL de etanol (grau HPLC) nos poços da fileira de diluição do extrato, com exceção do primeiro poço;
- No primeiro poço, adicionar 200 μL do extrato da amostra;
- No segundo poço, adicionar 100 μL retirados do primeiro poço e agitar (a agitação foi feita com a própria pipeta, retirando e retornando o extrato ao poço algumas vezes);
- No terceiro poço, adicionar 100 μL retirados do segundo poço e agitar;
- Seguir com este procedimento até o último poço, que ficará com o volume final de 200 μL .

Os extratos das amostras, depois de diluídos, foram transferidos imediatamente para a placa de análise, no volume de 10 μL para cada poço, em duplicata. Deixou-se evaporar totalmente, dentro da capela de fluxo laminar, para dar prosseguimento ao ensaio. Durante a preparação das placas, tomou-se o cuidado de não encostar a ponteira na borda dos poços, para evitar contaminação dos poços vizinhos.

Lembrando que na placa de análise, foi sempre utilizada uma fileira para amostra e uma para branco, intercalando sempre as fileiras de amostra e branco, a fim de garantir que não ocorreria contaminação cruzada (Figura 17). Além disso, a fileira do branco foi adicionada primeira, como forma de reduzir as chances de contaminação.

Figura 17: Demonstração da disposição do controle positivo (17β -estradiol), da amostra e do branco (controle negativo) na placa de 96 poços.



3.3.6. Diluições da curva padrão do controle positivo 17β -estradiol

O ensaio YES foi sempre executado com a curva padrão do controle positivo 17β -estradiol como referência e a cada batelada de ensaios uma nova curva foi realizada. Para isso utilizou-se uma solução estoque na concentração de $54,48 \mu\text{g.L}^{-1}$ preparada a partir de 17β -estradiol (> 98%, Sigma-Aldrich[®]) em etanol (grau HPLC, Tedia[®]).

A diluição da curva foi realizada serialmente, na placa dedicada à diluição. O procedimento seguido foi o mesmo adotado anteriormente para os extratos das amostras (item 3.3.5), realizando-se diluições 1:2, conforme apresentado.

3.3.7. Preparo das placas de ensaio

O preparo das placas de ensaio foi realizado conforme exemplificado na Figura 18. As linhas A e C são a curva de 17β -estradiol, em duplicata. As linhas E e G são da amostra analisada, em duplicata. As linhas B, D, F e H são os brancos (somente etanol e meio de análise).

Figura 18: Placa de ensaio após 72 horas de incubação.



Para o preparo da placa de ensaio, inicialmente adicionou-se 10 μ L de etanol em cada poço nas linhas correspondentes aos brancos. Em seguida, foram transferidos 10 μ L, retirados da placa de diluição, de cada amostra para cada poço da linha correspondente da placa de ensaio. Após a evaporação completa das amostras, ficando somente a massa das mesmas, foram adicionados 200 μ L do meio de análise em cada poço, tomando-se o cuidado de colocar o meio de análise primeiro nas linhas com o branco, de modo a evitar uma eventual contaminação do meio de análise. Em seguida, colocou-se o meio de análise nas linhas de amostra, com o cuidado de trocar as ponteiras a cada amostra.

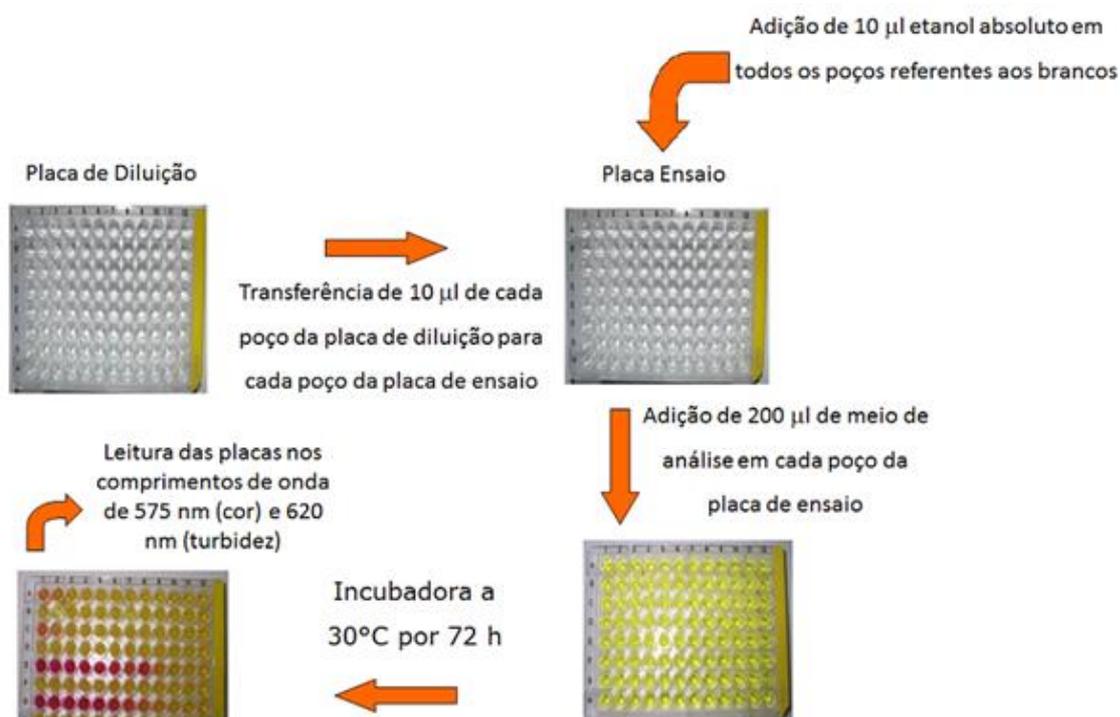
As placas foram então fechadas e lacradas com fita adesiva nas laterais e foram agitadas por 2 min em um agitador de placas de 96 poços (Marca IKA, modelo MS-3). Em seguida, foram incubadas em estufa aquecida a 30 °C, por 72 horas. Após o tempo de incubação, as placas foram retiradas da incubadora, já sendo possível observar a mudança de

coloração nos poços que passam de amarelo a tons de rosa, quando há atividade estrogênica, e aumento da turbidez nos mesmos, resultado da produção da β -galactosidase e do crescimento da levedura respectivamente.

Foi realizada a leitura das placas nos comprimentos de onda de 575 nm, para cor, e 620 nm para turbidez em um espectrofotômetro com entrada para placa de 96 poços (Marca Softmax, modelo SpectraMax M3).

A seguir (Figura 19) é possível visualizar o resumo de todas as etapas do ensaio.

Figura 19: Resumo das etapas do ensaio YES.



Após a leitura, as placas foram autoclavadas a 121°C por 15 minutos antes de serem descartadas. Vale lembrar que todo resíduo líquido ou sólido contendo o organismo geneticamente modificado foi autoclavado antes de ser descartado, a fim de inativar o organismo. Pois ainda que o OGM (organismo geneticamente modificado) do ensaio seja pertencente à classe de risco 1 (baixo risco individual e baixo risco para a comunidade - organismo que não causa doença ao homem ou animal) foi sempre seguido esse protocolo de biossegurança.

3.3.8. Concentrações de 17β-estradiol abrangidas na placa de ensaio

É importante salientar que apesar da solução estoque de 17β-estradiol ter a concentração de 54,48 μg.L⁻¹, a curva de 17β-estradiol abrange concentrações inferiores, na faixa de 2724 ng.L⁻¹ a 1,3301 ng.L⁻¹ no poço da placa de ensaio.

3.3.9. Avaliação do limite de detecção (LD)

Com base na curva dose-resposta do controle positivo 17β-estradiol, o limite de detecção para cada ensaio pode ser calculado. A atividade estrogênica superior a 10% do valor do branco foi avaliada como positiva.

3.3.10. Análise dos resultados do ensaio YES

Com os valores das leituras de absorvância seguiu-se a construção dos gráficos com as curvas dose-resposta do ensaio. Inicialmente, corrigiram-se os valores de absorvância, conforme a Equação 1, apresentada por Bila (2005).

$$Abs_{\text{corrigida Amostra}} = Abs_{575\text{Amostra}} - (Abs_{620\text{ Amostra}} - Abs_{620\text{ Branco}}) \quad \text{Equação 1}$$

A correção foi feita para cada poço da placa, utilizando os valores de absorvâncias obtidos nos dois comprimentos de onda para cada concentração na curva. Para calcular esta correção, utilizou-se a média dos valores das absorvâncias das duas fileiras de brancos correspondentes às amostras (linhas B e D ou F e H), resultando na média de 24 amostras de branco. Assim, os dados apresentados correspondem à média das absorvâncias das amostras analisadas em duplicata.

A curva dose-resposta do controle positivo 17β-estradiol foi construída relacionando-se os valores de absorvância corrigida em função da concentração, sendo expresso em ng.L⁻¹,

em escala logarítmica. Enquanto que as curvas dos extratos das amostras foram expressas em percentual, sendo construídas da mesma maneira da curva dose-resposta do controle positivo 17 β -estradiol.

Os valores de CE₅₀ do 17 β -estradiol foram determinados a partir de sua curva dose-resposta. O valor de CE₅₀ corresponde à concentração que elucida 50% da maior resposta obtida da β -galactosidase no ensaio YES, em relação à curva padrão. Para o 17 β -estradiol o CE₅₀ foi expresso em ng.L⁻¹.

Para as substâncias padrões também foi calculado o CE₅₀ a partir de sua curva padrão, também sendo expresso em ng.L⁻¹. Para o cálculo do CE₅₀ usou-se o programa Origin[®] 6.0

Para as amostras, calculou-se o equivalente estradiol (EQ-E₂) da máxima indução da β -galactosidase, através da interpolação dos dados da curva da amostra com os da curva do controle positivo 17 β -estradiol. Para esse cálculo utilizou-se a Equação 2, onde: y é o valor de Abs_{corrigida} da amostra, x é a concentração da substância estrogênica no ensaio, ou seja, o EQ-E₂ da amostra. A_1 , A_2 , x_0 e p são dados relativos à curva do controle positivo 17 β -estradiol, onde: A_1 é a máxima indução da β -galactosidase, A_2 é a mínima indução da β -galactosidase, x_0 é o valor de CE₅₀, p é a inclinação da região mediana da curva como estimado de uma regressão linear/log da parte linear da curva dose-resposta.

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^p} + A_2 \quad \text{Equação 2}$$

Após a aplicação da fórmula, o valor foi dividido pelo fator de concentração utilizado na EFS para se chegar ao valor real de EQ-E₂ da amostra.

Para avaliar o potencial estrogênico de cada substância padrão em relação ao controle positivo 17 β -estradiol, determinou-se a potência relativa estrogênica (PR). Esta relação é definida pela Equação 3.

$$PR = \frac{CE_{50}(17\beta\text{-estradiol})}{CE_{50}(\text{amostra})} \quad \text{Equação 3}$$

Para isso, admitiu-se que o controle positivo 17β -estradiol possui potência relativa 1, e partindo desse princípio, quando o valor da PR é maior que 1, significa que a substância padrão analisada possui maior estrogenicidade em relação ao controle positivo (17β -estradiol). Quando a PR é menor que 1, significa que a amostra possui menor potencial estrogênico em relação ao controle positivo.

Em algumas amostras pode ocorrer toxicidade (Figura 20), ou seja, alguns compostos presentes nas amostras podem proporcionar a inibição do crescimento da levedura. A inibição do crescimento da levedura é facilmente visualizada pela ausência de turbidez no fundo do poço. Nesse caso utiliza-se a relação apresentada por Frische et al. (2009), que utiliza o controle da absorbância a 620 nm como ferramenta para quantificar a inibição do crescimento da levedura devido a toxicidade das amostras, conforme a relação apresentada na Equação 4.

Figura 20: Placa de 96 poços apresentando toxicidade nos primeiros poços das fileiras A, C, E, e G.



$$Toxicidade = 1 - \left(\frac{Abs_{620(amostra)}}{Abs_{620(branco)}} \right)$$

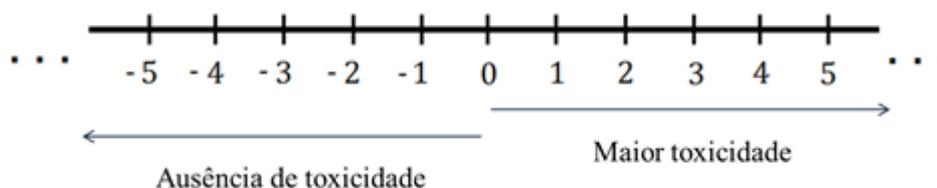
Equação 4

Na Equação 4, $Abs_{620(amostra)}$ corresponde à medida da leitura de absorbância a 620 nm de cada diluição da amostra, ou seja, à média da duplicata de cada um dos poços da linha da amostra. Já $Abs_{620(branco)}$ corresponde à media da leitura da absorbância a 620 nm para as duas

linhas de branco correspondentes à cada amostra analisada em duplicata. Assim, neste cálculo é considerada a média de 24 poços.

Quanto a interpretação do resultado da Equação 4, admite-se que não há toxicidade quando o resultado dá igual a zero, indicando que o crescimento de células na amostra e no branco foram iguais, ou menor do que zero, indicando que o crescimento de células na amostra foi ainda maior do que no branco. Há toxicidade quando o resultado é superior à zero, o que indica que cresceram menos células na amostra do que no branco (Figura 21).

Figura 21: Interpretação do resultado da equação de toxicidade do ensaio YES.



Ainda que visualmente a amostra não apresente toxicidade, é recomendada a aplicação da Equação 4 a fim de assegurar a veracidade do resultado.

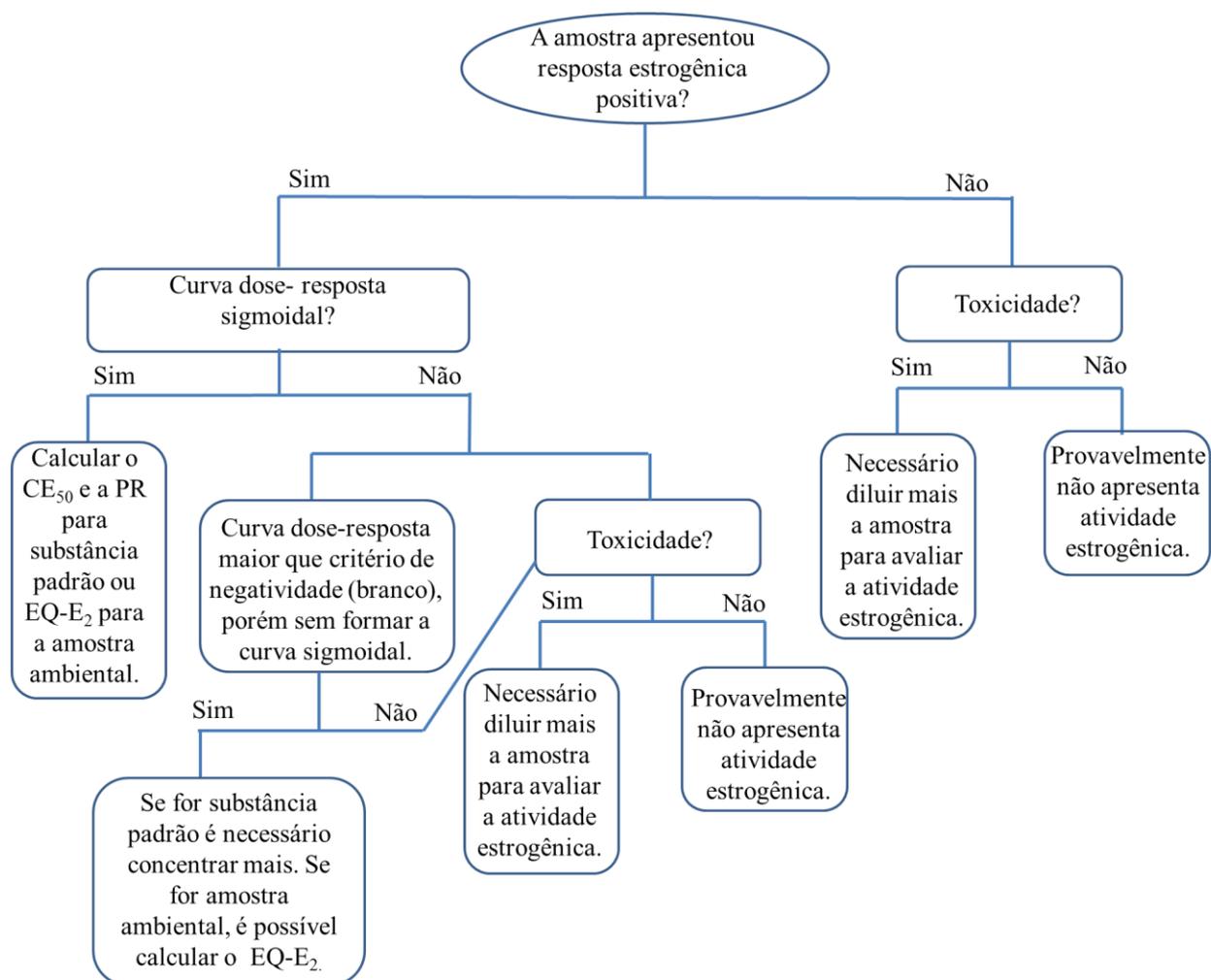
A Equação 4 deve ser aplicada primeiramente no extrato da amostra 100% concentrado (1º poço da placa de ensaio), pois se houver inibição do crescimento da levedura, essa será a primeira concentração a se observar a ocorrência. Após a aplicação da fórmula se a inibição foi de fato observada, aplica-se a Equação 4 para os poços seguintes até que a inibição não seja mais observada. A inibição é expressa em percentual em comparação ao crescimento da levedura no controle negativo (branco).

Em suma, para a expressão dos resultados do ensaio YES seguiu-se o fluxograma da Figura 22. Onde primeiro se verifica se amostra apresentou resposta estrogênica positiva, caso não tenha apresentado, verifica-se a presença de toxicidade conforme Equação 4, caso tenha toxicidade se dilui mais a amostra, caso não tenha, provavelmente a amostra não é estrogênica, ou a estrogenicidade está abaixo do limite de detecção do ensaio.

Se a amostra apresentou resposta estrogênica positiva formando uma curva sigmoidal, calcula-se o CE_{50} e a PR se for substância padrão, se for amostra ambiental calcula-se o EQ-

E₂. Caso a amostra não apresente curva dose-resposta sigmoidal, mas apresente uma resposta maior que o critério de negatividade (10% do branco), se for amostra ambiental é possível calcular o EQ-E₂, porém se for uma substância padrão é preciso prepará-la mais concentrada para atingir a curva sigmoidal e assim calcular o CE₅₀ e a PR.

Figura 22: Fluxograma para a expressão dos resultados do ensaio YES.



3.4. Ensaio de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Primeiramente foi realizado o pré-inóculo em frascos de cultura, como descrito no item 3.3.3.2., onde foi realizado de dois tipos (diferenciados pelo horário de inoculação): Quatro frascos tipo 1 e dois frascos tipo 2, iniciado 12 horas após o tipo 1.

Em seguida, foram feitos os inóculos em frascos tipo erlenmeyers previamente esterilizados com tampão de algodão (a 121 °C por 15 minutos) e de capacidade de 500 mL, contendo 200 mL de meio de cultivo (preparado conforme ANEXO 1).

Ao todo foram 3 inóculos em duplicatas realizados em diferentes dias e horários (24, 30 e 36 horas após o pré inóculo dos frascos tipo 1) para garantir o acompanhamento do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* nas suas diferentes fases.

Para a realização do inóculo homogeneizou-se os frasco de pré-inóculos: frasco 1 com o frasco 2, para inocular o erlenmeyr de 24 horas, frasco 3 com o 4 para inocular o erlenmeyr de 30 horas e frasco 5 com o 6, para inocular o erlenmeyr de 36 horas.

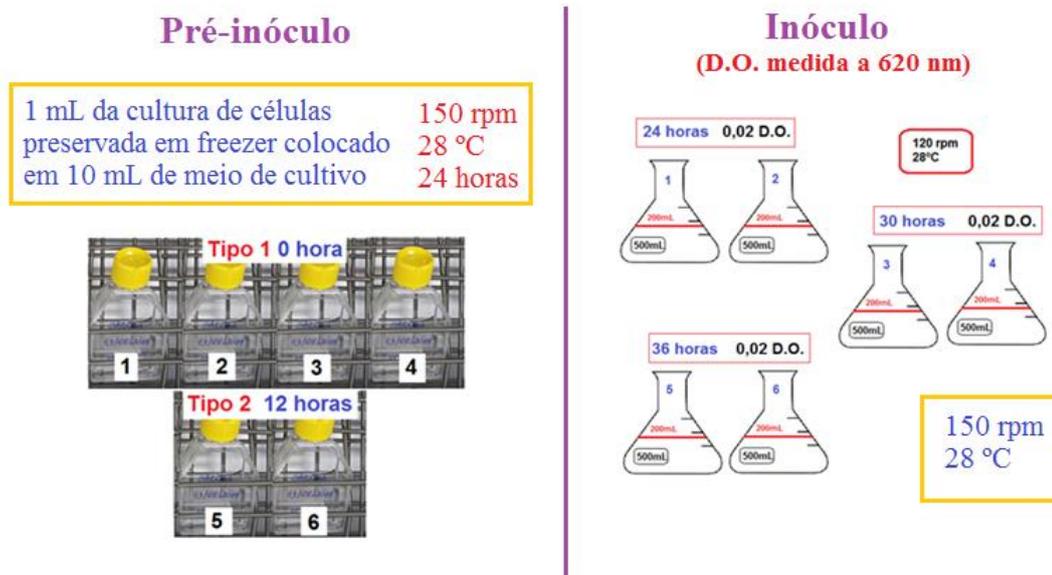
A homogeneização é importante para garantir que os dois frascos erlenmeyrs (duplicatas) sejam inoculados igualmente, o inóculo foi feito de modo a atingir 0,02 de densidade ótica (D.O.) a 620 nm, sendo este o início da curva de crescimento. Após cada inóculo, o erlenmeyr foi incubado a 28 °C, a 150 rpm. E a cada hora estipulada foi feita a leitura da densidade ótica no espectrofotômetro da marca Shimadzu, modelo UV-1800.

Foram feitas leituras da densidade ótica dos inóculos realizados em duplicatas nos erlenmeyrs. Intercalou-se os horários de leitura das diferentes duplicatas de inóculos de modo a se ter a leitura de hora em hora por 72 horas. Ao fim foi montada a curva de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* emendando as leituras das duplicatas dos três tipos de inóculos. E assim obteve-se a curva de crescimento da levedura em um período de 72 horas.

Na Figura 23 é possível visualizar o esquema do horário de inoculação da cepa *Saccharomyces cerevisiae* nos frascos de pré inóculo e de inóculo.

Vale ressaltar que todo procedimento de pré-inóculo, inóculo e abertura dos erlenmeyers para retirada de uma alíquota para a leitura da D.O. foi realizado em capela de fluxo laminar horizontal. E a alíquota que foi retirada da capela para registro da D.O. foi descartada, não retornando ao frasco.

Figura 23: Esquema do horário de inoculação da cepa *Saccharomyces cerevisiae* nos frascos de pré inóculo e de inóculo para o ensaio de crescimento da levedura.



3.5. Quantificação do composto 17α -etinilestradiol por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE-FLU)

As amostras do Rio Guandu também foram analisadas por CLAE, a fim de quantificar o composto 17α -etinilestradiol. Para isso foi utilizado o cromatógrafo líquido modelo Breeze2, fabricado pela Waters Corporation[®]. As condições cromatográficas de realização das análises foram: fluxo de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ de fase móvel, sendo $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ de acetonitrila grau HPLC (Tedia[®]) e $0,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ de água ultrapura.

A metodologia seguida foi a descrita por Cordeiro (2009) com algumas modificações, o volume injetado foi de $50 \mu\text{L}$ de amostra para detecção por fluorescência nos comprimentos de onda de 230 nm e 280 nm de excitação e 306 nm de emissão.

A fase estacionária (coluna cromatográfica) foi a PAH (Waters Corporation[®]) nas dimensões de $4,6 \times 250 \text{ mm}$ e com partícula de 5 micras mantida sob a temperatura de $26 \text{ }^\circ\text{C}$ com auxílio do forno de colunas. A temperatura do amostrador automático foi fixada a $18 \text{ }^\circ\text{C}$. O tempo de corrida fixado para as amostras foi de 30 minutos em função do efeito matriz e para os padrões foi de 15 minutos.

3.5.1. Preparo da curva analítica

A curva analítica do 17 α -etinilestradiol, usada na CLAE, foi preparada com concentrações na faixa de 2,0 a 10,0, $\mu\text{g.L}^{-1}$ e foi obtida pela diluição em acetonitila.

A construção da curva foi realizada através da injeção dos padrões em diferentes concentrações por três vezes, sendo determinada em função da média dos valores obtidos da triplicata.

3.5.2. Avaliação do limite de detecção (LD)

O limite de detecção do 17 α -etinilestradiol foi definido como a quantidade mínima de substância observada como uma razão sinal/ruído. Esta foi expressa em função de que o valor do limite de detecção deve ser de 2 a 3 vezes maior que a amplitude do ruído (INMETRO, 2010).

3.5.3. Avaliação do limite de quantificação (LQ)

Visando a análise de níveis traços a concentração mais baixa da curva analítica foi adotada como o limite de quantificação, sendo isto determinado como descrito em INMETRO (2010).

3.6. Ensaio de toxicidade aguda

Para as amostras do Rio Guandu, foram realizados ensaios ecotoxicológicos com três organismos-teste de níveis tróficos diferentes: um decompositor (bactéria luminescente *Aliivibrio fischeri*), consumidor primário (microcrustáceo *Daphnia similis*), um consumidor secundário (peixe *Danio rerio*). Os ensaios foram realizados seguindo as metodologias descritas nas normas da ABNT: NBR 15411-3 (ABNT, 2012), NBR 12713 (ABNT, 2009) e NBR 15088 (ABNT, 2006), respectivamente.

3.6.1. Organismo-teste: *Aliivibrio fischeri*

Não se realizou diluição, o teste foi sempre realizado em duplicata, analisando 0,9 mL da amostra junto com 0,1 mL da cultura líquida da bactéria *Aliivibrio fischeri*. A cada bateria de teste foi utilizado um controle negativo, o qual se utilizou a substância NaCl 2%. O tempo de contato da amostra com a bactéria foi de 30 minutos. Sendo avaliada a bioluminescência da bactéria em cada amostra. O programa estatístico usado foi SDI Microtox OMNI 4.1, sendo os resultados expressos em CE50 (concentração que elucida 50% da resposta).

3.6.2. Organismo-teste: *Daphnia similis*

As amostras foram analisadas nas concentrações 100% e 50% utilizando água de cultivo como controle negativo e também como diluente das amostras. Foram expostos 5 organismos para 10 mL de cada concentração, sendo feito em quadriplicata, totalizando 20 organismos por diluição. O teste tem duração de 48 horas, sendo 16 horas em presença de luz e 8 horas no escuro, em temperatura de 20 °C. Ao final de 48 horas foi verificada a quantidade de organismos imóveis em cada tubo de 10 mL do teste. O programa estatístico usado foi TRIMMED SPEARMAN-LCPIN, sendo os resultados expressos em CE₅₀ (concentração que elucida 50% da resposta).

3.6.3. Organismo-teste: *Danio rerio*

As amostras foram analisadas apenas na concentração de 100%, utilizando água de cultivo como controle negativo. Foram expostos 10 organismos em 1 litro de amostra, sendo mantidos em contato por 48 horas. Ao término desse período, os organismos mortos foram contabilizados. O programa estatístico usado foi GWBASIC. Sendo os resultados expressos em CL₅₀ (concentração letal média - concentração para a qual morrem 50% dos indivíduos expostos).

3.7. Parâmetros físico-químicos

Todas as amostras do Rio Guandu foram caracterizadas com base nos seguintes parâmetros físico-químicos: pH, turbidez, DQO (demanda química de oxigênio), nitrogênio amoniacal, fósforo, COD (carbono orgânico dissolvido), série sólidos, seguindo metodologias descritas em APHA, AWWA, WEF (APHA, 2012) de acordo com os métodos específicos para cada parâmetro. A Tabela 7 apresenta os parâmetros físico-químicos com as respectivas metodologias empregadas.

Já as amostras de água do Rio Santa Lucía foram caracterizadas pelos parâmetros de condutividade, temperatura e pH.

Tabela 7: Parâmetros físico-químicos e suas respectivas metodologias descritas em APHA (2012).

Parâmetros	Métodos
pH	4500 - H+ B
Turbidez (NTU)	2130 B
DQO (mg O ₂ .L ⁻¹)	5220 D
Nitrogênio amoniacal (mg NH ₃ .L ⁻¹)	4500-NH3 D
Fósforo Total (mg.L ⁻¹)	4500 – P E
Carbono orgânico dissolvido (mg.L ⁻¹)	5310 B
Série sólidos* (mg.L ⁻¹)	2540 B, 2540 C, 2540 D, 2540 E, 2540 F2540 G

* Série sólidos: Sólidos Totais, sólidos dissolvidos totais e sólidos suspensos totais.

Vale ressaltar que todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia Sanitária da UERJ (LES), exceto as análises que foram feitas em campo com equipamentos portáteis e a extração em fase sólida das amostras do Rio Santa Lucía, as quais foram extraídas no laboratório de Biodiversidade no Centro Universitário Regional Leste (CURE) da Universidade de la Republica no Uruguai e foram trazidas, ainda no cartucho, para o LES para a realização do ensaio YES

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

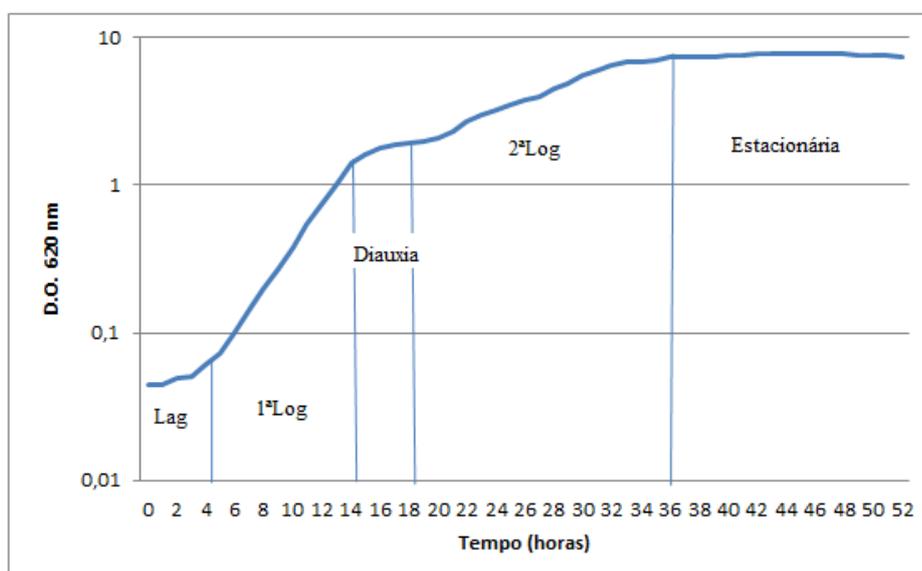
4.1. Crescimento da cepa *Saccharomyces cerevisiae* recombinante

Foi possível observar as fases clássicas da curva de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como apresentado na Tabela 8 e Figura 24.

Tabela 8: Fases da curva de crescimento observadas na *Saccharomyces cerevisiae* recombinante.

Fases	Tempo (horas)	Acontecimento
Lag	0 – 4	Fase inicial de adaptação do organismo ao meio de cultura.
1ª Log	4 – 14	Fase onde ocorre alto consumo de glicose pelo metabolismo fermentativo (glicólise), e acúmulo de etanol, os genes do metabolismo respiratório estão reprimidos.
Diauxia	14 – 18	Fase onde há uma parada no crescimento celular, nesta fase os citocromos e as enzimas mitocondriais são produzidos.
2ª Log	18 – 36	Fase onde as células têm todas as proteínas e citocromos para o metabolismo respiratório. Há o crescimento de células, contudo, o metabolismo é fermentativo.
Estacionária tardia	36 – 52	Fase onde a razão entre o número de células que se dividem e morrem é igual, não havendo crescimento celular.

Figura 24: Curva de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* recombinante em meio de cultivo do ensaio YES.



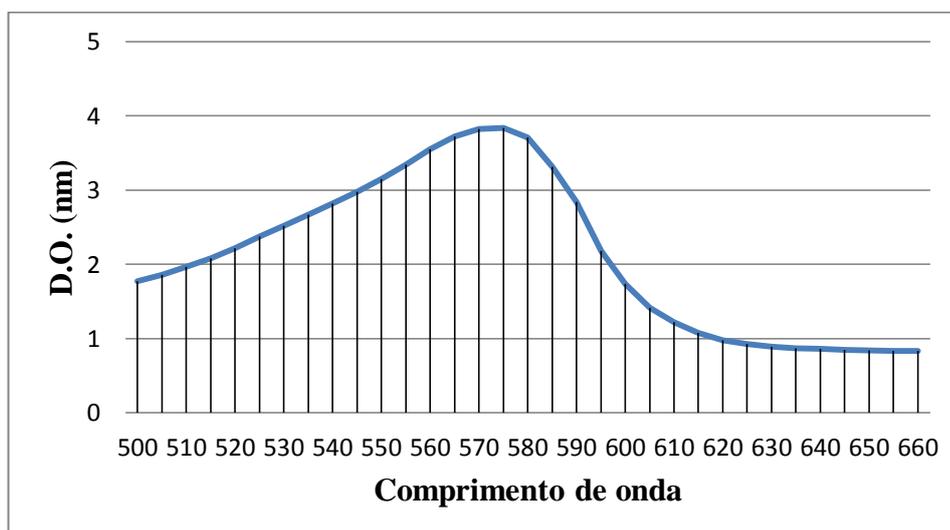
A partir do conhecimento das fases de crescimento da levedura, constatou-se que a mesma atingia a fase 2ª log com 18 horas de crescimento. Com esse dado foi possível detectar em que fase a levedura foi utilizada por Routledge e Sumpter (1996), pois somente foi dito em seu estudo que a cepa foi usada com 24 horas de crescimento, porém não foi evidenciada em qual fase ela se encontrava. Sendo assim, após o esclarecimento das fases de crescimento, o ensaio YES foi sempre iniciado com a levedura na fase 2ª log.

4.2. Ensaio YES

No ensaio YES, o potencial estrogênico das amostras ou das substâncias padrões a serem analisadas é medido colorimetricamente pela mudança de cor do substrato cromogênico (CPRG) presente no meio de análise, essa mudança de cor é resultado da degradação do CPRG (amarelo) em CPR (rosa). Essa degradação é realizada pela enzima β -galactosidase que é produzida como resposta à ligação da substância estrogênica no REh da levedura.

Para a aferição da estrogenicidade no ensaio YES, diversos autores (DENIER et al., 2009; SVODOBOVÁ et al., 2009; HAMBLEN et al., 2003; ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996) utilizaram o comprimento de onda de 540 nm. Neste estudo, foi realizada uma leitura em varredura da maior concentração do controle positivo (2724 ng.L^{-1}) utilizada no ensaio YES e constatou-se melhor absorção no comprimento de onda 575 nm (Figura 25).

Figura 25: Espectro de absorção da atividade da enzima β -galactosidase no ensaio YES.

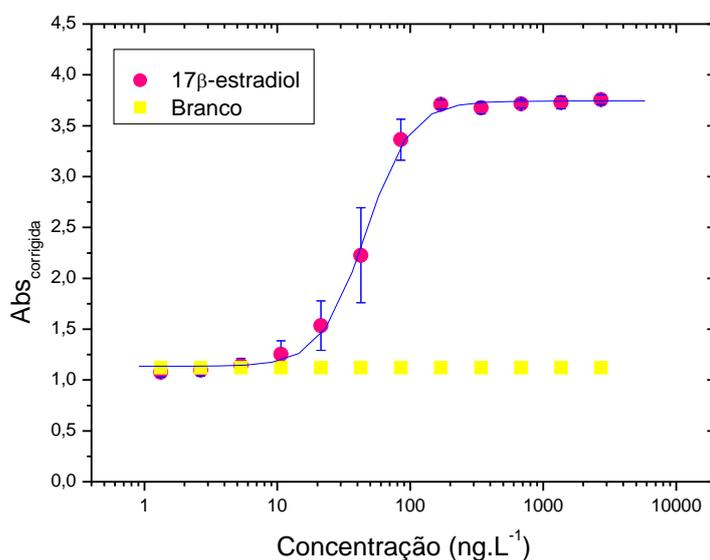


A partir disso, nesse trabalho optou-se por usar o comprimento de onda 575 nm para aferição da estrogenicidade, ou seja, aferição da cor que é o resultado da degradação do CPRG (amarelo) em CPR (rosa) através da enzima β -galactosidase que é produzida como resposta à ligação da substância estrogênica no REh da levedura.

4.2.1. Controle positivo 17 β -estradiol

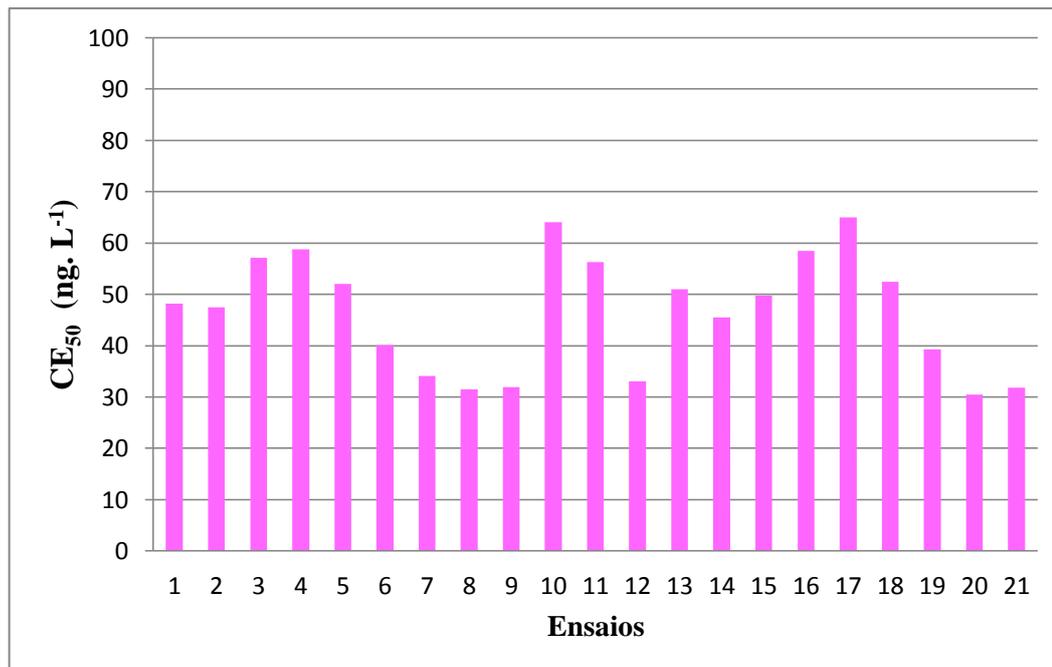
Para cada ensaio, uma curva dose-resposta do controle positivo 17 β -estradiol foi determinada, produzida na faixa de 2724 ng.L⁻¹ a 1,3301 ng.L⁻¹. O limite de detecção do ensaio foi de $10,13 \pm 3,65$ ng.L⁻¹. (Figura 26).

Figura 26: Curva dose-resposta padrão do controle positivo 17 β -estradiol no ensaio YES.



Ao todo, foram realizados 21 ensaios com o controle positivo, sendo a média do CE₅₀ de $46,6 \text{ ng.L}^{-1} \pm 11,38$ (Figura 27), o que se aproxima do resultado encontrado por Beck et al. (2006) que foi 49 ng.L^{-1} , e ficando bem próximo também ao CE₅₀ encontrado por diversos outros autores (FIC et al., 2014; RUTISHAUSER et al., 2014; BALSIGER et al., 2010), valores apresentados na Tabela 4.

Figura 27: Valores de CE_{50} do controle positivo 17β -estradiol em todos os ensaios YES realizados no período do estudo.

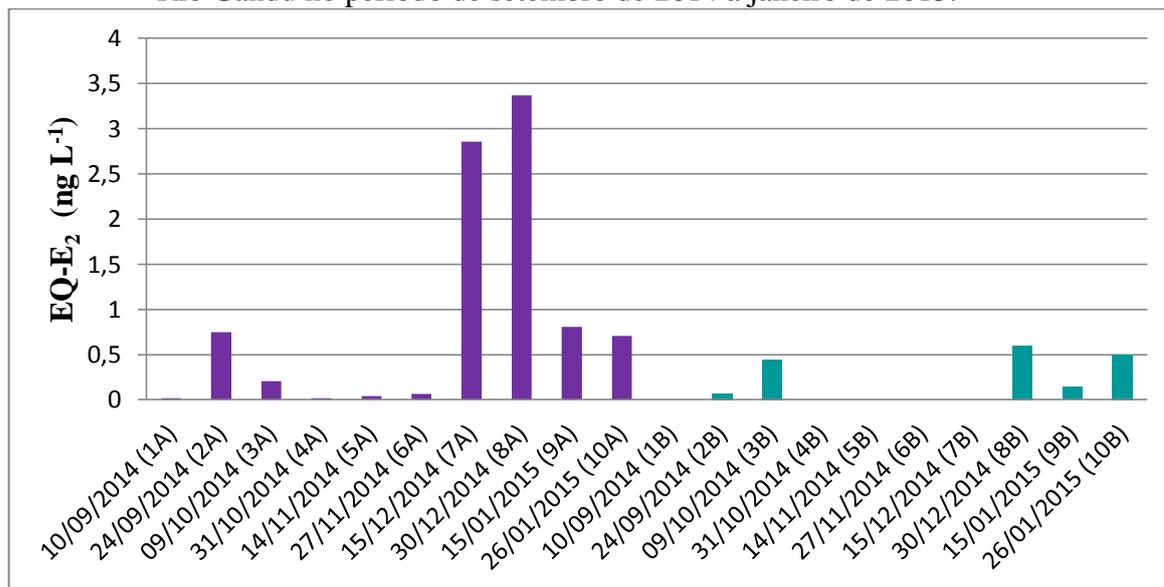


4.2.2. Determinação da atividade estrogênica nas amostras do Rio Guandu

Em diversos municípios da região sudeste do Brasil, as condições de saneamento podem ser descritas como precárias. Os dados relativos a 2008 revelam que, dos 1668 municípios dessa região, 1.586 têm sistemas de coleta de esgotos em operação. No entanto, apenas 808 municípios têm instalações de tratamento de esgotos e o tratamento de águas residuais a nível secundário (biológico) só é realizado em 461 municípios (IBGE, 2010). Sendo assim, em muitas localidades o esgoto atinge os sistemas aquáticos sem qualquer tipo de tratamento ou quando é tratado, este é um tratamento precário. Esse fato justifica os elevados resultados de atividade estrogênica encontrados no Rio Guandu (Figura 28).

Todas as amostras de água bruta apresentaram atividade estrogênica, variando de 0,015 a 3,37 ng.L⁻¹. Além disso, das 10 amostras de água potável, 5 apresentaram atividade estrogênica, tendo a concentração máxima de EQ-E₂ igual a 0,6 ng.L⁻¹. (As curvas dose-respostas encontram-se no ANEXO 2).

Figura 28: Valores de EQ-E₂ (ng.L⁻¹) das amostras de água bruta e potável provenientes do Rio Gandu no período de setembro de 2014 a janeiro de 2015.



Os resultados encontrados foram bem parecidos com os encontrados por Dias et al. (2015), que também analisaram a água superficial do Rio Guandu. Dias et al. (2015) realizaram o ensaio YES utilizando dois diferentes meios de preparo da amostra na etapa da filtração: usando apenas a membrana 1,2 µm e usando também a membrana de 0,45 µm.

Comparando os resultados obtidos nesse estudo com os obtidos por DIAS et al. (2015), quando utilizou a membrana de 0,45 µm (a mesma usada neste trabalho) para filtração da amostra, é possível perceber grande semelhança nos resultados, pois a concentração máxima de estrogenicidade encontrada por Dias et al. (2015) foi de 3,1 ng.L⁻¹ e a desse estudo foi de 3,37 ng.L⁻¹.

Zeng et al. (2013) estudou a atividade estrogênica em água potável da China e encontrou resultados variando de 0,0352 ng.L⁻¹ a 1,511 ng.L⁻¹, apesar de áreas de estudo diferentes, ou seja, água potável proveniente de diferentes rios e estações de tratamentos, os resultados são bem próximos, visto que nesse estudo a mínima atividade estrogênica encontrada em água potável foi de 0,07 ng.L⁻¹ e a máxima foi de 0,6 ng.L⁻¹.

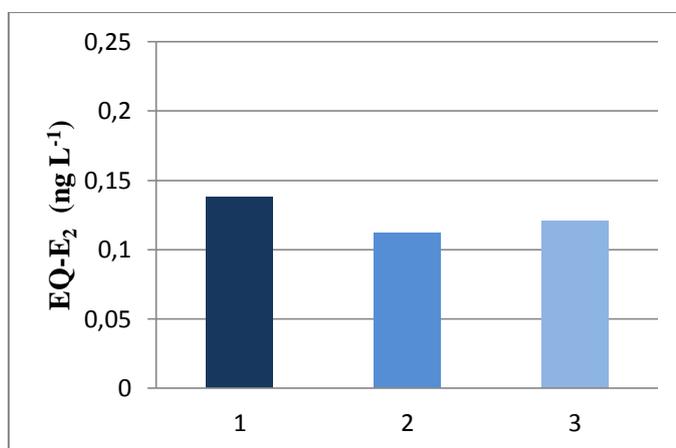
A presença de atividade estrogênica no Rio Guandu também foi previamente estudada por Kuster et al. (2009), porém não pelo ensaio YES mas por cromatografia líquida acoplada a espectrofotômetro de massa. Foi detectada a presença de compostos estrogênicos como a progesterona, fitoestrogênios e estrogênios e seus derivados conjugados. A progesterona,

provavelmente, pela sua estrutura química, fornece uma resposta estrogênica no ensaio YES (WANG et al., 2005), ao contrário de alguns derivados conjugados (estradiol-17-glucoronídeo e estriol-16-glucoronídeo) encontrados por Kuster et al. (2009), os quais não apresentam estrogenicidade pelo ensaio YES. No entanto, esses compostos são facilmente convertidos em estriol e estradiol por enzimas produzidas por bactérias presentes no esgoto e na água. Assim, essas substâncias podem também ser responsáveis pela significativa atividade estrogênica encontrada nas amostras de água coletadas no âmbito desse estudo.

4.2.3. Determinação da atividade estrogênica das amostras do Rio Santa Lucía, Uruguai

Conforme descrito na metodologia, foram realizadas três campanhas, em três pontos do Rio Santa Lucía. Em cada ponto foram coletadas três réplicas de água e três réplicas de sedimento. As amostras foram analisadas e somente na coleta de fevereiro de 2015, da amostra de água, do canal San Francisco foi encontrada atividade estrogênica (Figura 29). (As curvas dose-respostas das amostras analisadas encontram-se no ANEXO 3).

Figura 29: Valores de EQ-E₂ das amostras (triplicata) de água coletada em 18/02/2015 no canal San Francisco do Rio Santa Lucía.



O valor de equivalente estradiol encontrado nessa triplicata que apresentou estrogenicidade foi bem próximo nas três réplicas: 0,13 ng.L⁻¹, 0,11 ng.L⁻¹ e 0,12 ng.L⁻¹. Sendo a média 0,12 ng.L⁻¹ ± 0,01.

Um dos motivos de ter se achado atividade estrogênica em somente um ponto, pode ser porque o uso da área ao redor da Bacia de Santa Lucía com destino urbano-industrial é pequeno (1,1%), o que reduz a quantidade de efluente lançada na bacia (ACHKAR et al., 2004). Além disso, o Uruguai possui uma população menor quando comparada ao Brasil, o que também reduz o lançamento de esgoto em corpos hídricos.

Ademais, houve a necessidade da adaptação da metodologia de extração dos sedimentos, onde foi usado um agitador tipo vortex em vez de um ultrassom, pois o laboratório onde foi realizada a extração não possuía o equipamento de ultrassom. Essa modificação na metodologia pode ter dificultado a determinação da atividade estrogênica, visto que os xenoestrogênios tendem a adsorverem nos sedimentos devido a sua moderada natureza hidrofóbica (WANG et al., 2011) e estudos recentes apontam para a presença de xenoestrogens no sedimento de ecossistemas aquáticos (GARCÍA-ALONSO et al., 2011; TUIKKA et al., 2011; SCHNELL et al., 2013; WU et al., 2015)

4.2.4. Inibição do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* por toxicidade da amostra

Alguns estudos, como o conduzido por Bistan et al. (2011) Beck et al (2006) e Beresford et al. (2000) observaram inibição do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* durante o período de incubação do ensaio, o que é regularmente associado a presença de toxicidade na amostra estudada. Este comportamento é mais frequente quando se analisa amostras extraídas de efluente de esgoto sanitário, como é o caso de Bistan et al. (2011).

Visualmente, nenhuma amostra desse estudo apresentou toxicidade, provocando a inibição do crescimento da levedura no ensaio YES, porém para garantia do resultado visual, foi aplicada a Equação 4 (item 3.3.10.) descrita por Frische et al. (2009), onde ele utilizou o controle da absorbância a 620 nm como ferramenta para quantificar a inibição do crescimento da levedura devido a toxicidade das amostras.

A inibição do crescimento da levedura foi determinada no extrato da amostra 100% (1º poço da placa de ensaio), e quando se observou toxicidade nesse poço, aplicou-se nos poços seguintes até que a inibição não fosse mais observada (Tabela 9).

Tabela 9: Estimativa da Toxicidade das amostras do Rio Guandu e do Rio Santa Lucía.

Localidade	Tipo de amostra	Data e código da amostra	Concentração da amostra	
			100%	50%
Rio Guandu	Água bruta	10/09/2014 (1A)	-0,02	-
		24/09/2014 (2A)	-0,23	-
		09/10/2014 (3A)	-0,26	-
		31/10/2014 (4A)	-0,11	-
		14/11/2014 (5A)	-0,09	-
		27/11/2014 (6A)	-0,13	-
		15/12/2014 (7A)	-0,23	-
		30/12/2014 (8A)	-0,25	-
		15/01/2015 (9A)	-0,17	-
		26/01/2015(10A)	-0,18	-
	Água potável	10/09/2014 (1B)	-0,06	-
		24/09/2014 (2B)	-0,09	-
		09/10/2014 (3B)	-0,21	-
		31/10/2014 (4B)	-0,08	-
		14/11/2014 (5B)	-0,05	-
		27/11/2014 (6B)	0,004	-0,07
		15/12/2014 (7B)	0,065	-0,007
		30/12/2014 (8B)	-0,23	-
Rio Santa Lucía	Canal Campanero Chico	19/12/2014 (DA1)	0,03	-0,09
		16/01/2015 (JA1)	-0,1	-
		18/02/2015 (FA1)	-0,04	-
	Canal Arequita	19/12/2014 (DA2)	-0,07	-
		16/01/2015 (JA2)	-0,11	-
		18/02/2015 (FA2)	-0,1	-
	Canal San Francisco	19/12/2014 (DA3)	-0,07	-
		16/01/2015 (JA3)	-0,04	-
		18/02/2015 (FA3)	-0,16	-
	Canal Campanero Chico	19/12/2014 (DS1)	-0,05	-
		16/01/2015 (JS1)	-0,12	-
		18/02/2015 (FS1)	-0,03	-
	Canal Arequita	19/12/2014 (DS2)	0,02	-0,01
		16/01/2015 (JS2)	-0,04	-
18/02/2015 (FS2)		-0,02	-	
19/12/2014 (DS3)		-0,03	-	
16/01/2015 (JS3)		-0,04	-	
Canal San Francisco	18/02/2015 (FS3)	0,006	-0,07	

(-) Toxicidade não observada na concentração máxima do extrato da amostra (100%), não sendo necessário o cálculo nas demais concentrações.

A inibição do crescimento da levedura durante a incubação do ensaio pode acarretar falsos negativos nos resultados do ensaio YES, pois se não há levedura para que a substância estrogênica se ligue no Reh e desencadeie a indução da β -galactosidase que irá degradar o CPRG em CPR, logo, ainda que a amostra tenha compostos estrogênicos não será possível a detecção e quantificação desses DEs. Há também a possibilidade de ocorrer a inibição parcial do crescimento da levedura, aferindo uma menor quantificação de EQ-E₂, fornecendo também um falso resultado ao ensaio.

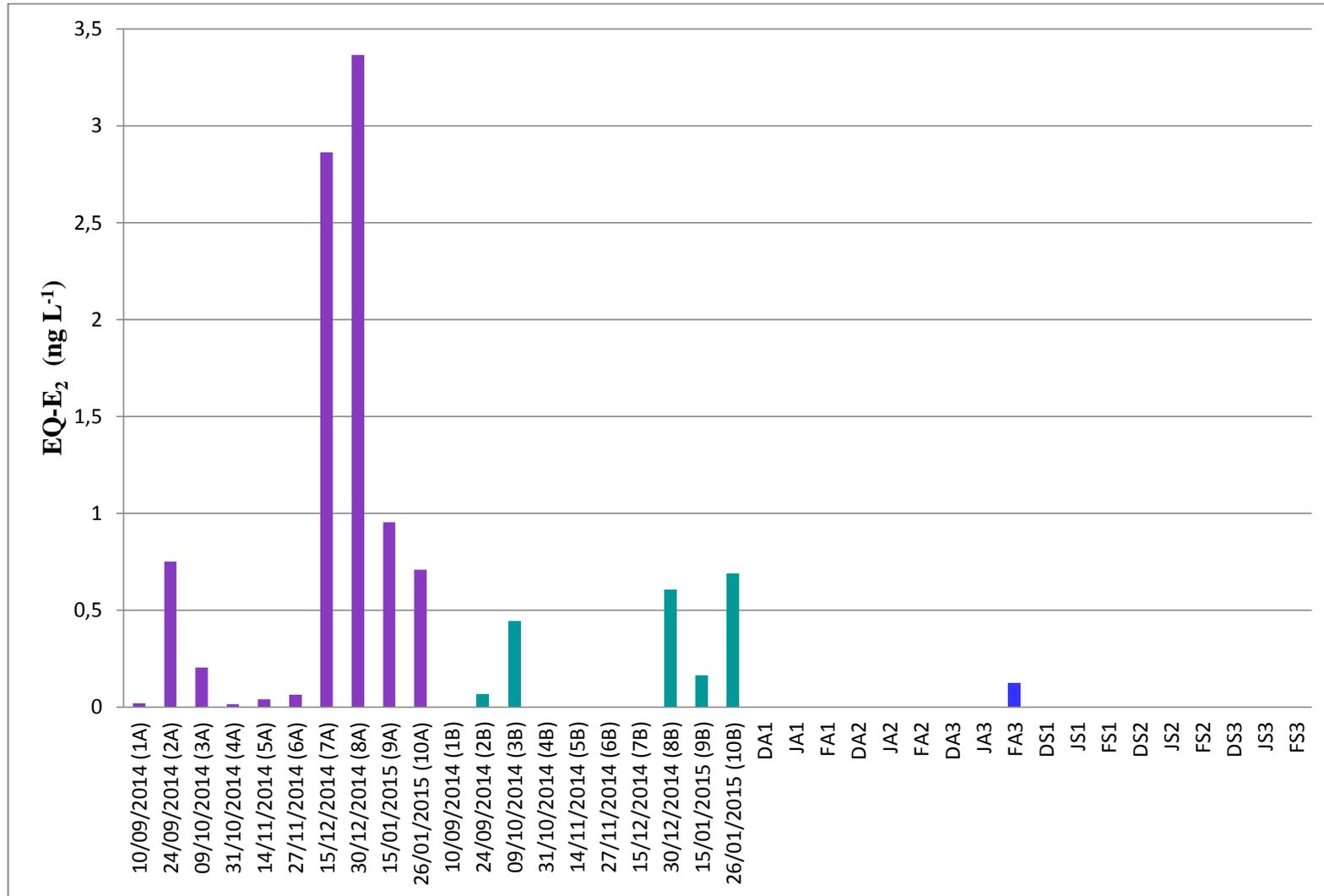
Um dos meios de solucionar o problema da toxicidade da amostra para a levedura é a diluição da amostra no ensaio, portanto a realização de diluições do extrato da amostra no ensaio é de extrema importância, pois caso não seja realizada poderá se ter um falso resultado do ensaio. Entretanto, não é possível usar a amostra sem a concentração da EFS, pois a concentração dos DEs poderia não estar dentro do limite de detecção do ensaio.

Nas amostras 6B e 7B do Rio Guandu observou-se uma pequena inibição do crescimento da levedura exposta ao extrato da amostra a 100% de concentração. A inibição do crescimento da levedura foi de 0,4% e 6,5%, respectivamente, quando comparado com o branco, ou seja, o crescimento da levedura foi 0,4% e 6,5% inferior ao observado para o branco. Porém no poço seguinte (amostra 50% concentrada) a inibição do crescimento não foi mais observada, o que permitiu o cálculo do real valor de atividade estrogênica.

Nas amostras do Rio Santa Lucía encontrou-se também pequena inibição do crescimento da levedura nos ensaios com água bruta coletada em dezembro no canal Campanero Chico (3% de inibição) e nos ensaios com os sedimentos coletados em dezembro no canal Arequita (2% de inibição) e em fevereiro no canal San Francisco (0,06% de inibição). A inibição do crescimento foi baixa e nas outras concentrações das amostras essa inibição não foi mais observada, não acarretando falsos negativos aos resultados dos ensaios.

4.2.5. Comparação da atividade estrogênica entre Rio Guandu e Rio Santa Lucía

Na Figura 30, encontram-se os valores de EQ-E₂ de todas as amostras coletadas. As amostras do Rio Guandu encontram-se individualmente e para as triplicatas das amostras de água e de sedimento, dos três pontos do Rio Santa Lucía, foram calculadas as médias.

Figura 30: Valores de EQ-E₂ das amostras coletadas no Rio Guandu e no Rio Santa Lucía.

É possível observar que entre as duas fontes de abastecimento de água potável, o Rio Guandu encontra-se significativamente mais contaminado por desreguladores endócrinos com potencial estrogênico do que o Rio Santa Lucía. Vale ressaltar que entre os três pontos de coleta do Rio Santa Lucía, não se encontrou atividade estrogênica no sedimento de nenhum dos pontos.

Levando em consideração que a concentração de 1 ng.L^{-1} de estrogênios já está associada a efeitos danosos aos seres visos (MATTHIESSEN et al., 2006; ROUTLEDGE et al., 1998), esse valor foi tomado como referência para esse estudo. A Tabela 10 retrata uma melhor visualização das amostras que apresentaram EQ-E₂ superior a 1 ng.L^{-1} e a sua incidência.

Das amostras do Rio Guandu, 75% apresentaram atividade estrogênica, sendo que 20% das amostras de água bruta apresentaram EQ-E₂ superior a 1 ng.L^{-1} . Valores de EQ-E₂ inferiores a 1 ng.L^{-1} foram observados nas amostras de água potável do Rio Guandu e nas amostras do Rio Santa Lucía (Tabela 10).

Tabela 10: Máximo valor de EQ-E₂ e incidência de valores de EQ-E₂ maiores que 1 ng.L^{-1} .

Localização	Tipo de amostra	Máximo EQ-E ₂ (ng.L^{-1})	EQ-E ₂ > 1 ng.L^{-1} incidência (%)
Rio Guandu (Brasil)	Água bruta	3,37	20
	Água potável	0,6	0
Rio Santa Lucía (Uruguai)	Água bruta	0,12	0
	Sedimento	Nd	0

nd: não detectado

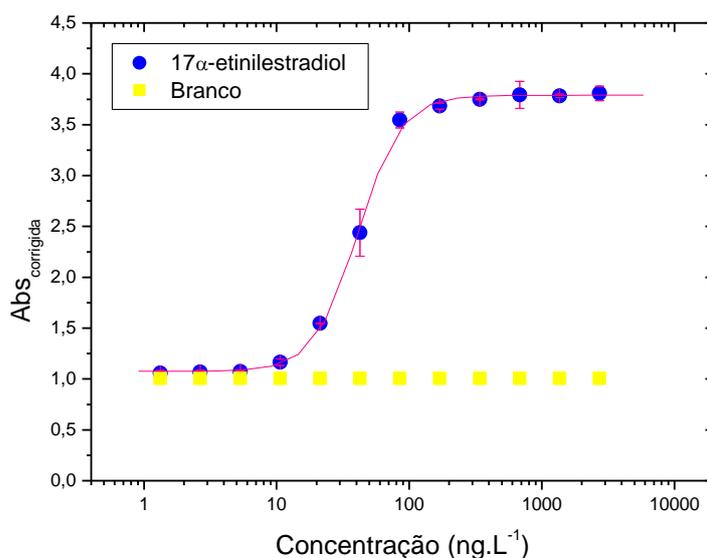
4.2.6. Atividade estrogênica do composto 17 α -etinilestradiol

Para a determinação da curva dose-resposta do composto 17 α -etinilestradiol utilizou-se a mesma concentração utilizada para a curva do controle positivo 17 β -estradiol, ou seja, a faixa de concentração foi de 2724 ng.L^{-1} a $1,3301 \text{ ng.L}^{-1}$. Obteve-se a curva dose-resposta apresentada na Figura 31.

O 17 α -etinilestradiol, desenvolvido a partir da adição de um radical etinil à molécula de 17 β -estradiol, no carbono 17. Segundo Combalbert e Hernandez-Raquet (2010) e Iarc,

(2007) esta diferença faz com que o 17α -etinilestradiol possua maior potencial estrogênico e também se torne mais resistente à degradação com relação ao composto original. No ensaio YES essa diferença foi observada, pois o 17α -etinilestradiol apresentou potência relativa de 1,59, o que vai de encontro ao relatado por diversos autores (BALSIGER et al., 2010; CAJTHAML et al., 2009; BECK et al., 2006; RUTISHAUSER et al., 2004; MURK et al., 2002;).

Figura 31: Curva dose-resposta do composto 17α -etinilestradiol na faixa de concentração 2724 ng.L^{-1} a $1,3301 \text{ ng.L}^{-1}$.



4.3. Caracterização físico-química das amostras

4.3.1. Rio Guandu

O rio Guandu é um rio de captação de água para abastecimento público após tratamento. Segundo o INEA (Instituto Estadual do Meio Ambiente), a média do Índice de Qualidade da Água (IQA) do ano de 2014 foi 68,7 e o de mês de janeiro de 2015 foi de 52,4, o que classifica o rio na categoria média, ou seja, de águas apropriadas para o tratamento convencional visando o abastecimento público (<http://www.inea.rj.gov.br/> - acesso em 13 de fevereiro de 2015)

Foram determinados parâmetros físico-químicos nas amostras de água, no período de setembro de 2014 a janeiro de 2015, a fim de verificar e avaliar a qualidade da água nos pontos de amostragem, os resultados encontram-se na Tabela 11.

Para a maioria das amostras o pH ficou próximo de 7. A turbidez variou de 0,1 a 6,3 NTU. Quase todas as amostras tiveram valores de DQO abaixo do limite de detecção. O nitrogênio amoniacal variou de 0,2 a 4,45 mg.L⁻¹. O fósforo ficou abaixo do limite de detecção em 25% das amostras, mas nas que a quantificação foi possível, ele variou de 0,19 a 2,31 mg.L⁻¹. Já o carbono orgânico dissolvido variou de 0,62 a 4,9 mg.L⁻¹, sendo que para a maioria das amostras ficou abaixo de 2 mg.L⁻¹. Os sólidos dissolvidos totais variaram de 50 a 410 mg.L⁻¹ para água potável e de 30 a 326 mg.L⁻¹ para água bruta. E os sólidos suspensos totais variaram de 0 a 38 mg.L⁻¹ para água potável e de 2 a 80 mg.L⁻¹ para água bruta.

Tabela 11: Parâmetros físico-químicos das águas bruta e potável provenientes do Rio Guandu, coletadas no período de setembro de 2014 a janeiro de 2015.

Tipo de amostra	Data e código das amostras	pH	Turbidez (NTU)	DQO	(mg.L ⁻¹)				
					Nitrogênio amoniacal	Fósforo	COD	SDT	SST
Água bruta	10/09/2014 (1A)	7,4	2,5	*	0,29	2,31	1,54	108	50
	24/09/2014 (2A)	7,47	6,3	1	0,48	*	2,18	86	2
	09/10/2014 (3A)	7,85	2,6	2	0,41	*	1,80	108	42
	31/10/2014 (4A)	8,03	1,4	*	4,45	0,23	1,59	88	6
	14/11/2014 (5A)	8,1	0,45	3	2,15	*	2,90	132	8
	27/11/2014 (6A)	9,73	1,24	*	2,16	0,89	2,59	110	10
	15/12/2014 (7A)	13,16	1,78	*	2,09	1,57	2,17	236	8
	30/12/2014 (8A)	7,66	1,78	*	1,1	0,24	3,18	156	28
	15/01/2015 (9A)	7,47	2,1	*	1,35	0,31	4,90	326	36
	26/01/2015(10A)	7,78	1,8	*	1,59	0,24	2,65	30	80
Água potável	10/09/2014 (1B)	7,61	0,91	*	0,20	0,22	0,75	82	30
	24/09/2014 (2B)	8,22	1,5	*	0,20	*	0,62	410	6
	09/10/2014 (3B)	8,02	0,7	*	1,82	*	1,18	160	30
	31/10/2014 (4B)	8,71	0,6	1	2,36	0,28	1,11	100	36
	14/11/2014 (5B)	12,38	3,1	*	0,42	1,75	1,21	50	0
	27/11/2014 (6B)	9,39	1,3	*	2,27	0,19	0,97	330	8
	15/12/2014 (7B)	10,52	1,36	*	1,58	0,58	1,45	174	28
	30/12/2014 (8B)	9,6	0,1	*	0,71	0,37	0,90	242	2
	15/01/2015 (9B)	6,86	1,8	*	1,59	0,24	2,64	104	38
	26/01/2015(10B)	6,94	0,83	*	2,44	0,81	1,60	86	32

*Abaixo do limite de detecção

4.3.2. Rio Santa Lucía

O Rio Santa Lucía faz parte do principal sistema fluvial do Uruguai, as características da qualidade da água nos pontos coletados encontram-se na Tabela 12. A temperatura ficou entre 23,7 e 28,5 °C, O pH permaneceu em torno de 7 e o oxigênio dissolvido em torno de 8 mg.L⁻¹.

Tabela 12: Parâmetros físico-químicos das amostras de água coletadas no Rio Santa Lucía, nos meses de dezembro de 2014, janeiro e fevereiro de 2015.

Parâmetros	19/12/2014			16/01/2015			18/02/2015		
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3
Temperatura (°C)	23,7	26,9	26,2	25,0	26,5	24	28	28,5	28,3
pH	7,8	7,72	8,05	7,33	7,76	7,34	7,89	8,17	8,0
OD (mg.L ⁻¹)	8,22	8,33	8,29	8,26	8,17	8,34	8,3	8,28	8,3

4.4. Ensaio de toxicidade

As amostras do Rio Guandu, tanto de água bruta (coletada antes da ETA) como de água potável, coletadas entre setembro de 2014 a janeiro de 2015 foram submetidas a ensaios de toxicidade com organismos-teste de três níveis tróficos: *Allivibrio fischeri* (decompositor), *Daphnia similis* (consumidor primário) e *Danio rerio* (consumidor secundário) e não apresentaram danos consideráveis aos organismos de modo a permitir o cálculo do CE₅₀ (%) ou CL₅₀(%).

O fato das amostras não apresentarem toxicidade aguda comprova que ainda que a amostra não seja tóxica, pode apresentar atividade estrogênica e em longo prazo ocasionar danos aos seres vivos, já que mesmo em baixas concentrações os contaminantes estrogênicos podem causar graves danos.

Além disso, a ausência de toxicidade aguda não elimina a caracterização da amostra como tóxica, sendo necessária uma avaliação de toxicidade crônica.

Com isso, pode-se concluir que os testes de toxicidade são ineficientes para predizerem os efeitos causados no meio ambiente por essa classe de micropoluentes, os desreguladores endócrinos. Visto que foram encontradas concentrações superiores a 1 ng.L^{-1} , concentração que está associada a efeitos danosos aos seres vivos (MATTHIESSEN et al., 2006; ROUTLEDGE et al., 1998) e ainda assim nos testes de toxicidade não foram observados danos consideráveis aos organismos de modo a permitir o cálculo do CE_{50} (%) ou CL_{50} (%).

Assim, os ensaios de atividade estrogênica, são os mais indicados para avaliar os efeitos em potencial dos DEs. Por isso, suas metodologias deverão ser completamente dominadas e implantadas como ensaios necessários para avaliar os efeitos de efluentes descartados.

4.5. Quantificação do composto 17α -etinilestradiol em amostras do Rio Guandu

O limite de quantificação (LQ) do método cromatográfico foi de $2 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ e o limite de detecção (LD) foi de $0,38 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$.

A construção da curva analítica foi realizada através da injeção de cada concentração do padrão por três vezes, sendo determinada em função da média dos valores das triplicatas de cada valor de concentração. No ANEXO 4 se encontra a curva analítica estabelecida no equipamento para o método desenvolvido para o composto 17α -etinilestradiol.

Os valores de linearidade foram estabelecidos em função da equação $Y = ax + b$, e estes foram respectivamente $r = 0,9932$ (coeficiente de correlação) e $r^2 = 0,9865$ (coeficiente de determinação), o que são considerados adequados para os parâmetros do INMETRO.

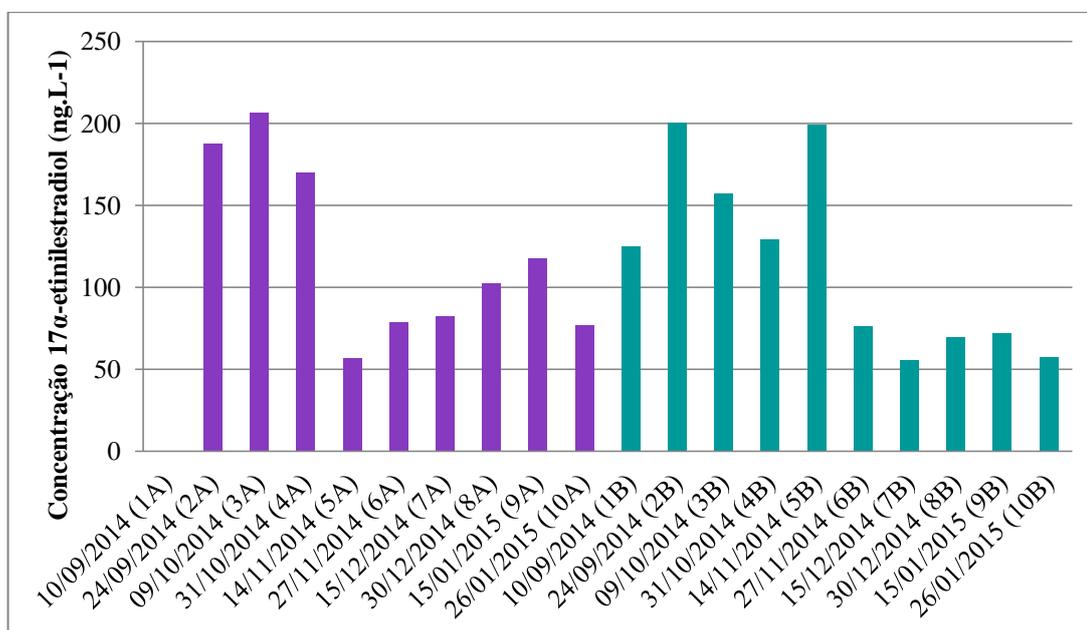
Com a curva analítica construída, as amostras foram injetadas, a Tabela 13 e a Figura 32 apresentam os valores das concentrações de 17α -etinilestradiol detectadas nas águas do Rio Guandu. No ANEXO 5 se encontram os cromatogramas das amostras analisadas.

Tabela 13: Concentrações de 17α -Ethinilestradiol encontradas nas amostras coletadas no Rio Guandu.

Tipo de amostra	Data de coleta	17α -etinilestradiol (ng.L ⁻¹)
Água Bruta	10/09/2014 (1A)	*
	24/09/2014 (2A)	187,83
	09/10/2014 (3A)	206,55
	31/10/2014 (4A)	169,77
	14/11/2014 (5A)	57,03
	27/11/2014 (6A)	78,34
	15/12/2014 (7A)	82,39
	30/12/2014 (8A)	102,01
	15/01/2015 (9A)	117,49
	26/01/2015(10A)	76,65
Água Potável	10/09/2014 (1B)	125,2
	24/09/2014 (2B)	200,46
	09/10/2014 (3B)	157,36
	31/10/2014 (4B)	129,18
	14/11/2014 (5B)	199,08
	27/11/2014 (6B)	76,53
	15/12/2014 (7B)	55,77
	30/12/2014 (8B)	69,58
	15/01/2015 (9B)	72,33
	26/01/2015(10B)	57,22

* Abaixo do limite de detecção

Figura 32: Concentração de 17α -etinilestradiol nas amostras de água bruta e potável provenientes do Rio Guandu.



Pelos dados apresentados foi possível detectar elevados níveis de 17α -etinilestradiol em 95% das amostras submetidas à CLAE, dado que a concentração de 1 ng.L^{-1} foi tomada como referência para esse estudo, já que esse valor está associado a efeitos danosos aos seres vivos (MATTHIESSEN et al., 2006; ROUTLEDGE et al., 1998).

Quando comparado as concentrações de 17α -etinilestradiol detectadas pela cromatografia líquida de alta eficiência com os valores de EQ-E₂ detectados pelo ensaio YES é possível perceber uma discrepância entre os resultados, a qual precisa ser estudada futuramente.

Ainda que os resultados da metodologia analítica e do ensaio YES tenham sido bastante diferentes, estes foram comparados como forma de mensurar a alteração na estrogenicidade pelos dois métodos.

Nessa comparação, pode-se dizer que um dos compostos contribuintes para o resultado de EQ-E₂ encontrado no ensaio YES para as amostras do Rio Guandu é o 17α -etinilestradiol. O fato de ter se encontrado atividade estrogênica na amostra 1A pelo ensaio YES e o composto 17α -etinilestradiol não ter sido detectado pela cromatografia líquida, mostra que o composto 17α -etinilestradiol pode não ser o responsável pela atividade estrogênica encontrada nessa amostra.

A questão do composto 17α -etinilestradiol ter sido encontrado numa quantidade muito maior do que a atividade estrogênica total relatada pelo ensaio YES em todas as outras amostras, poderia ser explicada pelo limite máximo de indução da β -galactosidase no ensaio YES, além da possível presença de compostos inibidores de atividade estrogênica, como os acetatos de alquilfenóis conforme relatado pela União Européia (COMPREHEND, 2002).

Os alquilfenóis estão presentes em substâncias químicas como antioxidantes, poliestireno modificado, surfactantes e PVC e, portanto, como a água potável foi coletada da torneira, é possível que o encanamento para fornecimento da água seja de PVC o que justificaria a presença de alquilfenóis na amostra e conseqüentemente a questão do composto 17α -etinilestradiol ter sido encontrado numa quantidade muito maior do que a atividade estrogênica total relatada pelo ensaio YES. A presença de alquilfenóis na água bruta também é possível através, por exemplo, dos detergentes e emulsificantes, visto que o Rio Guandu recebe efluentes industriais e domésticos. Porém para uma resposta conclusiva seria

necessário a realização de análises químicas para a comprovação da existência desses compostos nas amostras.

No que se refere à presença de compostos estrogênicos terem sido detectados, em algumas coletas, em maiores concentrações na água potável do que na água bruta do rio Guandu, pode ser facilmente justificado pelo tempo de retenção da água a ser tratada na ETA, ou seja, apesar das amostras terem sido coletadas no mesmo dia, não necessariamente a amostra de água potável é referente à amostra de água bruta que foi coletada. Além disso, vale ressaltar que o tratamento realizado na ETA Guandu é um tratamento convencional, o qual não remove os DEs.

5. CONCLUSÃO

O ensaio YES se mostrou uma importante ferramenta de monitoramento e avaliação da qualidade de águas e sedimentos quanto à presença de atividade estrogênica.

Das amostras do Rio Guandu, 75% apresentaram atividade estrogênica, sendo que 20% das amostras de água bruta apresentaram EQ-E₂ superior a 1 ng.L⁻¹. O que é motivo de preocupação, visto que essa concentração já é responsável por efeitos danosos aos seres vivos.

As amostras de água potável também apresentaram estrogenicidade, o que indica que o tratamento da água deve ser otimizado a fim de alcançar a remoção desses micropoluentes. Sabe-se que os processos convencionais de tratamento de água não removem completamente os micropoluentes.

Valores de EQ-E₂ inferiores a 1 ng.L⁻¹ foram detectados nas amostras do Rio Santa Lucía, o que não descarta a necessidade de atenção, dado que o efeito sinérgico, em matrizes ambientais, desses micropoluentes é sempre preocupante.

Os testes de toxicidade aguda foram ineficientes para predizerem os efeitos causados no meio ambiente por essa classe de micropoluentes, os desreguladores endócrinos estrogênicos. Assim, os ensaios de atividade estrogênica, são os mais indicados para avaliar os efeitos em potencial dos DEs. Por isso, suas metodologias deverão ser completamente dominadas e implantadas como ensaios necessários para avaliar os efeitos de efluentes descartados.

Nas amostras submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência, foi possível detectar elevados níveis de 17 α -etinilestradiol em 95% delas. Porém quando comparado as concentrações de 17 α -etinilestradiol detectadas pela CLAE com os valores de EQ-E₂ detectados pelo ensaio YES é possível perceber uma discrepância entre os resultados, a qual precisa ser estudada futuramente.

REFERÊNCIAS

ACHKAR, M.; DOMÍNGUEZ, A.; PESCE, F. **Diagnóstico socioambiental participativo en Uruguay, Montevideo**. Ed: El Tomate Verde, 157 p. 2004.

AGUILAR, A.; BORRELL, A. **Abnormally high polychlorinated biphenyl levels in striped dolphins (*Steneoa coeruleoalba*) Affected by the 1990-1992 Mediterranean Epizootic**. The Science Total Environmental, v. 154, p. 237-247, 1994.

APHA; AWWA; WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22th edição. 1360 p. , 2012.

AQUINO, F. R. N.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia - princípios básicos e técnicas afins**. 1ª edição. Ed.: Interciência: Rio de Janeiro, 188 p, 2003.

ARENZON, A.; NETO, T. J. P.; GERBER, W. **Manual sobre a toxicidade em efluentes industriais**. CEP SENAI de Artes Gráficas Henrique d'Ávila Bertaso. Porto Alegre, 40 p., 2011.

BALSIGER, H.A.; DE LA TORRE, R.; LEE, W. Y.; COX, M. B. **A four-hour yeast bioassay for the direct measure of estrogenic activity in wastewater without sample extraction, concentration, or sterilization**. Science of the Total Environment, v. 408, p. 1422–29, 2010.

BARONTI, C., CURINI, R., D'ASCENZO, G., et al. **Monitoring Natural and Synthetic Estrogens at Activated Sludge Sewage Treatment Plants and in a Receiving River Water**. Enviromental Science Technology, v. 34, p. 5059-5066, 2000.

BECK, I-C.; BRUHN, R.; GANDRASS, J. **Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen**. Chemosphere, v. 63, p. 1870-78, 2006.

BELDOMENICO, P. M.; REY, F.; PRADO, W. S.; VILLARREAL, J. C.; MUÑOZ-DE-TORO, M.; LUQUE, E. H. **In ovum exposure to pesticides increases the egg weight loss and decreases hatchlings weight of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae)**. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 68, n. 2, p. 246–51, 2007.

BERESFORD, N., ROUTLEDGE, E. J., HARRIS, C. A. e SUMPTER, J. P. **Issues arising when interpreting results from an *in vitro* assay for estrogenic activity**. Toxicology and Applied Pharmacology, v. 162, p. 22-33, 2000.

BILA, D. M. **Degradação e Remoção da Atividade Estrogênica do Desregulador Endócrino 17 β -estradiol pelo Processo de Ozonização**. Tese de Doutorado em Ciências em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2005.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. **Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências**. Química Nova, v. 30, p.651-66, 2007.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. **Fármacos no Meio Ambiente**. Química Nova, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.

BINELLI, A.; BACCHETTA, R.; MANTECCA, P.; RICCIARDI, F.; PROVINI, A.; VAILATI, G. **DDT in zebra mussels from Lake Maggiore (N. Italy): level of contamination and endocrine disruptions**. Aquatic Toxicology, v. 69, n. 2, p. 175-188, 2004.

BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. **Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Process**. 1ª edição. Ed.: Lewis Publishers, 295 p., 2003.

BISTAN, M.; LOGAR, R. M.; TISLER, T. **Detection of estrogenic activity in Slovenian wastewaters by bioassay**. Central European Journal of Biology, v. 6, n. 5, p. 829-837, 2011.

BISTAN, M.; PODGORELEC, M.; LOGAR, R. M.; TISLER, T. **Yeast Estrogen Screen Assay as a Tool for Detecting Estrogenic Activity in Water Bodies**. Food Technol. Biotechnol., v. 50, n. 4, p. 427-433, 2012.

BITMAN, J.; CECIL, H. C.; HARRIS, S. J.; FRIES, G. F. **Estrogenic Activity of DDT in the Mammalian Uterus and Avian Oviduct**. Science, v. 162, p. 371-372, 1968.

BRIX, R.; NOGUEROL, T. N.; PIÑA, B.; BALAAM, J.; NILSEN, A. J.; TOLLEFSEN, K. E.; LEVY, W.; SCHRAMM, K. W.; BARCELÓ, D. **Evaluation of the suitability of recombinant yeast-based estrogenicity assays as a pre-screening toll in environmental samples**. Environment International, v. 36, n.4, p. 361-367, 2010.

CAJTHAML, T.; KRESINOVÁ, Z.; SVOBODOVÁ, K.; MÖDER, M. **Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi**. Chemosphere, v. 75, p. 745-750, 2009.

CANESI, L.; BORGHI, C.; CIACCI, C.; FABBRI, R.; LORUSSO, L. C.; VERGANI, L.; MARCOMINI, A.; POIANA, G. **Short-term effects of environmentally relevant concentrations of EDC mixtures on *Mytilus galloprovincialis* digestive gland**. Aquatic Toxicology, v. 87, n. 4, p. 272-279, 2008.

CAPALDO, A.; GAY, F.; VALIANTE, S.; DE FALCO, M.; SCIARRILLO, R.; MADDALONI, M.; LAFORGIA, V. **Endocrine-disrupting effects of nonylphenol in the newt, *Triturus carnifex* (Amphibia, Urodela)**. Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology & Pharmacology, v. 155, n. 2, p. 352-358, 2012.

CARGOUËT, M.; PERDIZ, D.; MOUATASSIM-SOUALI, A.; TAMISIER-KAROLAK, S.; LEVI, Y. **Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France)**. Science of the Total Environment, v. 324, n. 1-3, p. 55-66, 2004.

CHANDRASEKAR, G.; ARNER, A.; KITAMBI, S. S.; DAHLMAN-WRIGHT, K.; LENDAHL, M. A. **Developmental toxicity of the environmental pollutant 4-nonylphenol in zebrafish**. Neurotoxicology and Teratology, v. 33, n. 6, p. 752-764, 2011.

CIOCAN, C. M.; CUBERO-LEON, E.; PUINEAN, A. M.; HILL, E. M.; MINIER, C.; OSADA, M.; FENLON, K.; ROTCHELL, J. M. **Effects of estrogen exposure in mussels,**

Mytilusedulis, at different stages of gametogenesis. *Environmental Pollution*, v. 158, n. 9, p. 2977–2984, 2010.

COM - COMUNICACÃO DA COMISSÃO AO CONSELHO E AO PARLAMENTO EUROPEU. COM/99/0706. **Estratégia comunitária em matéria de desreguladores endócrinos – substâncias suspeitas de interferir com os sistemas hormonais dos seres humanos e dos animais**. Comissão das Comunidades Europeias, 1999.

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

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Endocrine Disruptors**. Disponível em <http://ec.europa.eu/environment/endocrine/documents/index_en.htm> Acessado em 20 de outubro de 2014.

COMPREHEND - COMMUNITY PROGRAMME OF RESEARCH ON ENDOCRINE DISRUPTERS AND ENVIRONMENTAL HORMONES. ENV4-CT98-0798, 2002.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. RESOLUCAO CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. Diário Oficial da União, 2011.

CORDEIRO, D. **Uso de bioindicador de efeito endócrino e validação do método para determinação de hormônios na água da Represa Municipal de São José do Rio Preto**. Dissertação de Mestrado em Química Analítica. Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

CUNHA, D. L. **Avaliação do Padrão de Consumo do 17 α -etinilestradiol e seu Impacto no Meio Hídrico no Município de Santa Maria Madalena – RJ**, Dissertação de Mestrado em Saúde Pública e Meio Ambiente. Escola Nacional de Saúde Pública (FIOCRUZ). Rio de Janeiro, 2013.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. **Cromatografia: um breve ensaio**. *Química Nova na Escola*, v. 7, p. 21-25, 1998.

DENIER, X.; HILL, E. M.; ROTCHELL, J.; MINIER, C. **Estrogenic activity of cadmium, copper and zinc in the yeast estrogen screen**. *Toxicology in Vitro*, v. 23, p. 569–573, 2009.

DIAS, A. C. V.; GOMES, F. W.; BILA, D. M.; SANT'ANNA, G. L.; DEZOTTI, D. **Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 120, p. 41–47, 2015.

DOMINGUES, L.; GUIMARÃES, P. M.R.; OLIVEIRA, C. **Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose/whey fermentation**. *Bioengineered Bugs*, v. 1, n. 3, p. 164-171, 2010.

EISENREICH, K. M.; KELLY, S. M.; ROWE, C. L. **Latent mortality of juvenile snapping turtles from the Upper Hudson River, New York, exposed maternally and via the diet to**

polychlorinated biphenyls (PCBs). Environmental Science & Technology, v. 43, n. 15, p. 6052–6057, 2009.

EUSTICE, D. C.; FELDMAN, P. A.; COLBERG-POLEY, A. M.; et al. **A sensitive method for the detection of beta-galactosidase in transfected mammalian cells.** Biotechniques, v. 11, n. 6, p. 739-43, 1991.

FIC, A.; ZEGURA, B.; GRAMEC, D.; MASIC, L. P. **Estrogenic and androgenic activities of TBBA and TBMEPH, metabolites of novel brominated flame retardants, and selected bisphenols, using the XenoScreen XL YES/YAS assay.** Chemosphere, v. 112, p. 362–369, 2014.

FINI, J.-B.; RIU, A.; DEBRAUWER, L. et al. **Parallel biotransformation of tetrabromobisphenol A in *Xenopus laevis* and mammals: *Xenopus* as a model for endocrine perturbation studies.** Toxicological Sciences, v. 125, n. 2, p. 359–367, 2012.

FINNEY, D. J. **The Meaning of Bioassay.** Biometrics, v.21, n.4, p. 785-798, 1965.

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

FRISCHE, T.; FAUST, M.; MEYER, W.; BACKHAUS, T. **Toxic masking and synergistic modulation of the estrogenic activity of chemical mixtures in a yeast estrogen screen (YES).** Environ. Sci. Pollut, v. 16, p. 593-603, 2009.

FRYE, C.; BO, E.; CALAMANDREI, G. et al. **Endocrine disrupters: a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behavior and neuroendocrine systems.** Journal of Neuroendocrinology, v. 24, n. 1, p. 144–159, 2012.

GAIDO, K. W.; LEONARD, L. S.; LOVELL, S. et al. **Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast based steroid hormone receptor gene transcription assay.** Toxicology and Applied Pharmacology, v. 143, p. 205-212, 1997.

GARCÍA-ALONSO, J.; GREENWAY, G. M.; MUNSHI, A.; GÓMEZ, J. C.; MAZIK, K. A.; KNIGHT, W. J.; HARDEGE, D; ELLIOTT, M. **Biological responses to contaminants in the Humber estuary: disentangling complex relationships.** Marine Environmental Research, v. 71, p. 295-303, 2011.

GIBERT, Y.; SASSI-MESSAI, S.; FINI, J.-B. et al. **Bisphenol A induces otolith malformations during vertebrate embryogenesis.** BMC Developmental Biology, v. 11, p. 4, 2011.

GUO, S.; QIAN, L.; SHI, H. et al. **Effects of tributyltin (TBT) on *Xenopus tropicalis* embryos at environmentally relevant concentrations.** Chemosphere, v. 79, n. 5, p. 529–533, 2010.

HAMBLEN, E.L; CRONIN, M. T.; SCHULTZ, T. W. **Estrogenicity and acute toxicity of selected anilines using a recombinant yeast assay**. *Chemosphere*, v. 52, n. 7, p. 1173-81, 2003.

HAN, Z.; JIAO, S.; KONG, D.; SHAN, Z.; ZHANG, X. **Effects of β -endosulfan on the growth and reproduction of zebrafish (*Danio rerio*)**. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, v. 30, n. 11, p. 2525–2531, 2011.

HANSEN, P. D.; DIZER, H.; HOCK, B.; et al. **Vitellogenin – a biomarker for endocrine disruptors**. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 17, p. 448-451, 1998.

HATEF, A.; ALAVI, S. M. H.; ABDULFATAH, A. et al. **Adverse effects of bisphenol A on reproductive physiology in male goldfish at environmentally relevant concentrations**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 76, n. 2, p. 56–62, 2012.

HUGGETT, D. B.; FORAN, C. M.; BROOKS, B. W.; WESTON, J.; PETERSON, B.; MARSH, K. E.; LA POINT, T. W.; SCHLENK, D. **Comparison of *in Vitro* and *in Vivo* Bioassays for Estrogenicity in Effluent from North American Municipal Wastewater Facilities**. *Toxicological Sciences*, v. 72, p. 77–83, 2003.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Combined estrogen–progestogen contraceptives and combined estrogen–progestogen menopausal therapy**. Volume 91. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. World Health Organization. Lyon, France, 2007.

IBGE, Instituto brasileiro de geografia e estatística. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (PNSB), 2008. Rio de Janeiro, Brazil. 2010.

INDA H.; INDARTE E. Informe de situación sobre fuentes de contaminación difusa em la cuenca del Río Santa Lucía. Convenio Jica-dinama. 2009.

INEA - INSTITUTO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE. A média do Índice de Qualidade da Água (IQA) do ano de 2014. Disponível em <<http://www.inea.rj.gov.br/>>. Acessado em 13 de fevereiro 2015.

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. 20 p. , 2010.

ISHIHARA, A.; MAKITA, Y.; YAMAUCHI, K. **Gene expression profiling to examine the thyroid hormone-disrupting activity of hydroxylated polychlorinated biphenyls in metamorphosing amphibian tadpole**. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, v. 25, n. 5, p. 303–311, 2011.

JARDIM, W. F.; MONTAGNER, C. C.; PESCARA, I. C.; UMBUZEIRO, G. A.; BERGAMASCO, A. M. D. D.; ELDRIDGE, M. L.; SODRÉ, F. F. **An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water**. *Separation and Purification Technology*, 84, 3–8, 2012.

JIN, S.; YANG, F.; LIAO, T. et al. **Enhanced effects by mixtures of three estrogenic compounds at environmentally relevant levels on development of Chinese rare minnow**

(*Gobiocypris rarus*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 33, n. 2, p. 277–283, 2012.

JOHNSON, A. .; BELFROID, A.; DI CORCIA, A. **Estimating steroid estrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent.** *Science of the Total Environment*, v. 256, n. 2–3, p. 163–173, 2000.

KOLPIN, D. W.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T. et al. **Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance.** *Environmental Science & Technology*, v. 36, n. 6, p. 1202–1211, 2002.

KÖRNER, W.; HANF, V.; SCHULLER, W.; BARTSCH, H.; ZWIRNER, M.; HAGENMAIER, H. **Validation and application of a rapid in vitro assay for assessing the estrogenic potency of halogenated phenolic chemicals.** *Chemosphere*, v. 37, p. 2395-2407, 1998.

KUSTER, M.; ALDA, M. J. L.; HERNANDO, M. D.; PETROVIC, M.; ALONSO, J. M.; BARCELÓ, D. **Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain).** *Journal of Hydrology*, v. 358, p. 112– 123, 2008.

KUSTER, M.; AZEVEDO, D. A.; LÓPEZ DE ALDA, M. J.; AQUINO NETO, F. R.; BARCELÓ, D. **Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental Waters from Rio de Janeiro (Brazil).** *Environment International*, v. 35, n. 7, p. 997–1003, 2009.

LEE, W.; KANG, C.-W.; SU, C.-K.; OKUBO, K.; NAGAHAMA, Y. **Screening estrogenic activity of environmental contaminants and water samples using a transgenic medaka embryo bioassay.** *Chemosphere*, v. 88, n. 8, p. 945–952, 2012.

LEECH, D.M., SNYDER, M.T., WETZEL, R.G. **Natural organic matter and sunlight accelerate the degradation of 17 β -estradiol in water.** *Science of the Total Environment*, v. 407, p. 2087-2092, 2009.

LI, B.; CAO, J.; XING, C.; WANG, Z.; CUI, L. **Assessing estrogenic activity and reproductive toxicity of organic extracts in WWTP effluents.** *Environ Toxicol Pharmacol*, v. 39, n. 2, p. 942-52, 2015.

LIU, Z. H.; KANJO, Y.; MIZUTANI, S. **Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment-physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: a review.** *Science of the Total Environment*, v. 407, p. 731-748, 2009.

LIU, S.; QIN, F.; WANG, H. et al. **Effects of 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A on steroidogenic messenger ribonucleic acid levels in the rare minnow gonads.** *Aquatic Toxicology*, v. 122-123, p. 19–27, 2012.

LORENZEN, A. A.; HENDE, J. G.; CONN, K. L. et al. **Survey of hormone activities in Municipal biosolids and animal manures**. *Environmental Toxicology*, v. 3, p. 216-225, 2004.

LUCENA, W. S. **Determinação de estrogênios em afluentes da lagoa de Araruama – RJ. Tese de Mestrado em Saúde Pública e Meio Ambiente**. Escola Nacional de Saúde Pública / Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2013.

MARKEY, C. M.; RUBIN, B. S.; SOTO, A. M.; et al. **Endocrine Disruptors: From Wingspread to Environmental Developmental Biology**. *Journal Steroids Biochemistry & Molecular Biology*, v. 1802, p. 1-10, 2003.

MATTHIESSEN, P.; ARNOLD, D.; JOHNSON, A. C.; PEPPER, T. J.; POTTINGER, T. G.; PULMAN, K. G. T. **Contamination of headwater streams in the United Kingdom by oestrogenic hormones from livestock farms**. *Sci. Total Environ*, v. 367, p. 616–630, 2006.

METCALFE, C. D.; KLEYWEGT, S.; LETCHER, R. J. et al. **A multi-assay screening approach for assessment of endocrine-active contaminants in wastewater effluent samples**. *Science of the Total Environmental*, v. 454-455, p. 132-140, 2013.

MURK, A. J.; LEGLER, J.; VAN LIPZIG, M. M.; MEERMAN, J. H.; BELFROID, A. C.; SPENKELINK, A.; VAN DER BURG, B.; RIJS, G. B.; VETHAAK, D. **Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays**. *Environ Toxicol Chem*, v. 21, n. 1, p. 16-23, 2002.

NBR 12713. ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de Ensaio com *Daphnia sp* (Crustacea, Cladocera)**. 3ª edição, 2009.

NBR 15088. ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de ensaio com peixes**. 2ª edição, versão corrigida, 2006.

NBR 15411-3. ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Ecotoxicologia Aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras aquosas sobre a emissão da bioluminescência de *Vibrio fischeri* (ensaio de bactéria luminescente). Parte 3: Método utilizando bactérias liofolizadas**. 2ª edição, 2012.

METCALFE, C. D.; KLEYWEGT, S.; LETCHER, R. J. et al. **A multi-assay screening approach for assessment of endocrine-active contaminants in wastewater effluent samples**. *Science of the Total Environmental*, v. 454-455, p. 132-140, 2013.

PAWLOWSKI, S.; TERNES, T. A.; BONERZ, M.; RASTALL, A. C.; ERDINGER, L.; BRAUNBECK, T. **Estrogenicity of solid phase-extracted water samples from two municipal sewage treatment plant effluents and river Rhine water using the yeast estrogen screen**. *Toxicology in Vitro*, v. 18, p. 129–138, 2004.

PAYNE, J. P.; RAJAPAKSE, N. A.; WILKINS, M.; KORTENKAMP, A. **Prediction and Assessment of the Effects of Mixtures of Four Xenoestrogens**. *Environmental Health Perspectives*, v. 108, p. 983-987, 2000.

PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. **Liquid chromatography–mass spectrometry in the analysis of emerging environmental contaminants**. *Anal Bioanal Chem*, v. 385, p. 422–424, 2006.

PORTER, K. L.; OLMSTEAD, A. W.; KUMSHER, D. M. et al. **Effects of 4-tert-octylphenol on *Xenopus tropicalis* in a long term exposure**. *Aquatic Toxicology*, v. 103, n. 3-4, p. 159–169, 2011.

PUY-AZURMENDI, E.; ORTIZ-ZARRAGOITIA, M.; VILLAGRASA, M. et al. **Endocrine disruption in thicklip grey mullet (*Chelon labrosus*) from the Urdaibai Biosphere Reserve (Bay of Biscay, Southwestern Europe)**. *The Science of the Total Environment*, v. 443, p. 233–244, 2013.

RAIMUNDO, C. C. M. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia**. Dissertação de Mestrado em Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Federal de Campinas. Campinas, 2007.

REIS FILHO, R. W.; ARAÚJO, J. C.; VIEIRA, E. M. **Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos**. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 817-822, 2006.

RODRIGUES, K. L. T. **Desenvolvimento de Metodologia Analítica para Determinação Simultânea de Microcontaminantes Emergentes em Águas Superficiais por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas**. Dissertação de mestrado em Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2012.

ROUTLEDGE, E. J.; SUMPTER, J. P. **Estrogenic Activity of Surfactants and Some of their Degradation Products Assessed Using a Recombinant Yeast Screen**. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 15, n. 3, p. 241-248, 1996.

ROUTLEDGE, E. J.; SHEAHAN, D.; DESBROW, C.; BRIGHTY, G. C.; WALDOCK, M.; SUMPTER, J. P. **Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and Roach**. *Environ. Sci. Technol*, v. 32, p. 1559-1565, 1998.

RUAN, T.; LIANG, D.; SONG, S.; SONG, M.; WANG, H.; JIANG, G. **Evaluation of the in vitro estrogenicity of emerging bisphenol analogs and their respective estrogenic contributions in municipal sewage sludge in China**. *Chemosphere*, v. 124, p. 150–155, 2015.

RUTISHAUSER B.V., PESONEN M., ESCHER B.I., et al. **Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three in vitro assays and chemical analysis of steroids**. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 23, n. 4, p. 857–864, 2004.

SANTAMARTA, J. **A ameaça dos disruptores endócrinos**. *Agroecol. e Desenv. Rur. Sustent*, v.2, n.3, 2001.

SCHMID, T.; GONZALEZ-VALERO, J.; RUFLI, H.; et al. **Determination of Vitellogenin Kinetics in Male Fathead Minnows (*Pimephales promelas*)**. *Toxicology Letters*, v. 131, p. 65-74, 2002.

SCHNELL, S.; OLIVARES, A.; PIÑA, B.; ECHAVARRI-ERASUN, B.; LACORTE, S.; PORTE, C. **The combined use of the PLHC-1 cell line and the recombinant yeast assay to assess the environmental quality of estuarine and coastal sediments.** Marine Pollution Bulletin, v. 77, p. 282–289, 2013.

SCHWENDIMAN, A. L.; PROPPER, C. R. **A common environmental contaminant affects sexual behavior in the clawed frog, *Xenopus tropicalis*.** Physiology & Behavior, v. 106, n. 4, p. 520–526, 2012.

SEMADS - SECRETARIA DE ESTADO DE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL. **Bacias Hidrográficas e Recursos Hídricos da Macrorregião Ambiental 2: Bacia da Baía de Sepetiba.** Rio de Janeiro, 2001.

SIFUENTES-ROMERO, I.; VÁZQUEZ-BOUCARD, C.; SIERRA-BELTRÁN, A. P.; GARDNER, S. C. **Vitellogenin in black turtle (*Chelonia mydas agassizii*): purification, partial characterization, and validation of an enzyme-linked immune sorbent assay for its detection.** Environmental Toxicology and Chemistry, v. 25, n. 2, p. 477–485, 2006.

SILVA, E.; RAJAPAKSE, N.; KORTENKAMP, A. **Something from Nothing – Eight Weak Estrogenic Chemicals Combined at Concentrations below NOECs Produce Significant Mixture Effects.** Environmental Science and Technology, v. 36, p. 1751–1756, 2002.

SONNENSCHNEIN, C.; SOTO, A. M. **An Updated Review of Environmental Estrogen and Androgen Mimics and Antagonists.** J. Steroid Biochem. Molec. Biol, v. 65, n. 1-6, p. 143–150, 1998.

SOTO, A. M.; SONNENSCHNEIN, C.; CHUNG, K. L.; FERNANDEZ, M. F.; OLEA, N., SERRANO, F. O. **The E-Screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants.** Environmental Health Perspectives, v. 103, n. 7, p. 113–122, 1995.

STOKER, C.; BELDOMÉNICO, P. M.; BOSQUIAZZO, V. L. et al. **Developmental exposure to endocrine disruptor chemicals alters follicular dynamics and steroid levels in *Caiman latirostris*.** General and Comparative Endocrinology, v. 156, n. 3, p. 603–612, 2008.

SVODOBOVÁ, K.; PLACKOVÁ, M.; NOVOTNÁ, V.; CAJTHAML, T. **Estrogenic and androgenic activity of PCBs, their chlorinated metabolites and other endocrine disruptors estimated with two in vitro yeast assays.** Science of the Total Environment, v. 407, p. 5921–5925, 2009.

TANGTIAN, H.; BO, L.; WENHUA, L.; SHIN, P. K. S.; WU, RUDOLF S S. **Estrogenic potential of benzotriazole on marine medaka (*Oryzias melastigma*).** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 80, p. 327–332, 2012.

TESKE, S. S.; ARNOLD, R. G. **Removal of natural and xeno-estrogens during conventional wastewater treatment.** Rev Environ Sci Biotechnol, v. 7, n. 2, p. 107–124, 2008.

TIAN, H.; LI, Y.; WANG, W.; WU, P.; RU, S. **Exposure to monocrotophos pesticide during sexual development causes the feminization/demasculinization of the reproductive traits and a reduction in the reproductive success of male guppies (*Poecilia reticulata*)**. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 263, n. 2, p. 163–170, 2012.

TUIKKA, A. I.; SCHMITT, C.; HOSS, S.; BANDOW, N.; VON DER OHE, P. C.; DE ZWART, D.; DE DECKERE, E.; STRECK, G.; MOTHE, S.; VAN HATTUM, B.; KOCAN, A.; BRIX, R.; BRACK, W.; BARCELO, D.; SORMUNEN, A. J.; KUKKONEN, J. V. **Toxicity assessment of sediments from three European river basins using a sediment contact test battery**. *Ecotoxicology Environmental Safety*, v. 74, p. 123–131, 2011.

USEPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis, report N° EPA/630/R-96/012**, Washington D. C., 1997.

VERDERAME, M.; PRISCO, M.; ANDREUCCETTI, P.; ANIELLO, F.; LIMATOLA, E. **Experimentally nonylphenol-polluted diet induces the expression of silent genes VTG and ER α in the liver of male lizard *Podarcis sicula***. *Environmental Pollution*, v. 159, n. 5, p. 1101–1107, 2011.

VIGANÒ, L.; BENFENATI, E.; VAN CAUWENBERGE, A. **Estrogenicity profile and estrogenic compounds determined in river sediments by chemical analysis, ELISA and yeast assays**. *Chemosphere*, v. 73, p. 1078–1089, 2008.

VILLENEUVE, D. L.; BLANKENSHIP, A. L.; GIESY, J. P. **Derivation and application of relative potency estimates based on in vitro bioassay results**. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 19, n. 11, p. 2835–2843, 2000.

WANG, J.; XIE, P.; KETTRUP, A.; SCHRAMM, K. W. **Inhibition of progesterone receptor activity in recombinant yeast by soot from fossil fuel combustion emissions and air particulate materials**. *Science of the Total Environment*, v. 349, p. 120–128, 2005.

WANG, L.; YING, G.; ZHAO, J.; LIU, S.; YANG, B.; ZHOU, L.; TAO, R.; SU, H. **Assessing estrogenic activity in surface water and sediment of the Liao River system in northeast China using combined chemical and biological tools**. *Environmental Pollution*, v. 159, p. 148–156, 2011.

WU, C.; HUANG, X.; LIN, J.; LIU, J. **Occurrence and fate of selected endocrine-disrupting chemicals in water and sediment from an urban lake**. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, v. 68, p. 225–236, 2015.

ZENG, Q.; CAO, W.; XU, L.; CHEN, Y.; YUN, L.; LIU, A.; ZHANG, J.; LU, W. **Spatial and temporal evaluations of estrogenic activity in tap water served by a water plant in Wuhan, China**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 91, p. 198–203, 2013.

ANEXO 1: Preparo das soluções do ensaio YES

Meio mínimo

O meio mínimo foi preparado adicionando-se os seguintes reagentes a 1L de água ultrapura:

13,61 g de KH_2PO_4

1,98 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

4,2 g de KOH

0,2 g de MgSO_4

1mL de solução de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (40mg/50mL de água ultrapura)

50 mg de L-leucina

50 mg de L-histidina

50 mg de adenina

20 mg de L-arginina

20 mg de L-metionina

30 mg de L-tirosina

30mg de L-isoleucina

30 mg de L-lisina-HCl

25 mg de L-fenilalanina

100 mg de ácido glutâmico

150 mg de L-valina

375 mg de L-serina.

Solução de glicose

A solução de glicose foi preparada a 20% m/v (20 g/100 mL), dissolvendo a glicose em água ultrapura.

Solução de ácido L-aspártico

A solução de ácido L-aspártico foi preparada na concentração de 4 mg.mL^{-1} , com água ultrapura.

Solução de L-treonina

A solução estoque foi preparada na concentração de 24 mg.mL^{-1} (600 mg/25 mL) com água ultrapura

Solução de sulfato de cobre (II)

A solução de sulfato de cobre (II) foi preparada na concentração de 20 mM (0,5g/100mL), com água ultrapura

Solução de vitamina

A solução de vitamina foi preparada adicionando-se os seguintes reagentes a 180 mL de água ultrapura:

8 mg de tiamina

8 mg de piridoxina

8 mg de pantetonato de cálcio

40 mg de inositol

20 mL de solução de biotina (2 mg/100 mL de água ultrapura)

Solução de CPRG (Clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosida)

A solução foi feita na concentração de 10 mgmL⁻¹, utilizando água ultrapura. Foi armazenada em frascos de vidro âmbar estéreis.

Meio de Cultivo

5 mL de solução de glicose

1,25 mL de solução de ácido L-aspartico

0,5 mL de solução de vitamina

0,4 mL de solução de L-treonina

125 μ L de solução de sulfato de cobre (II)

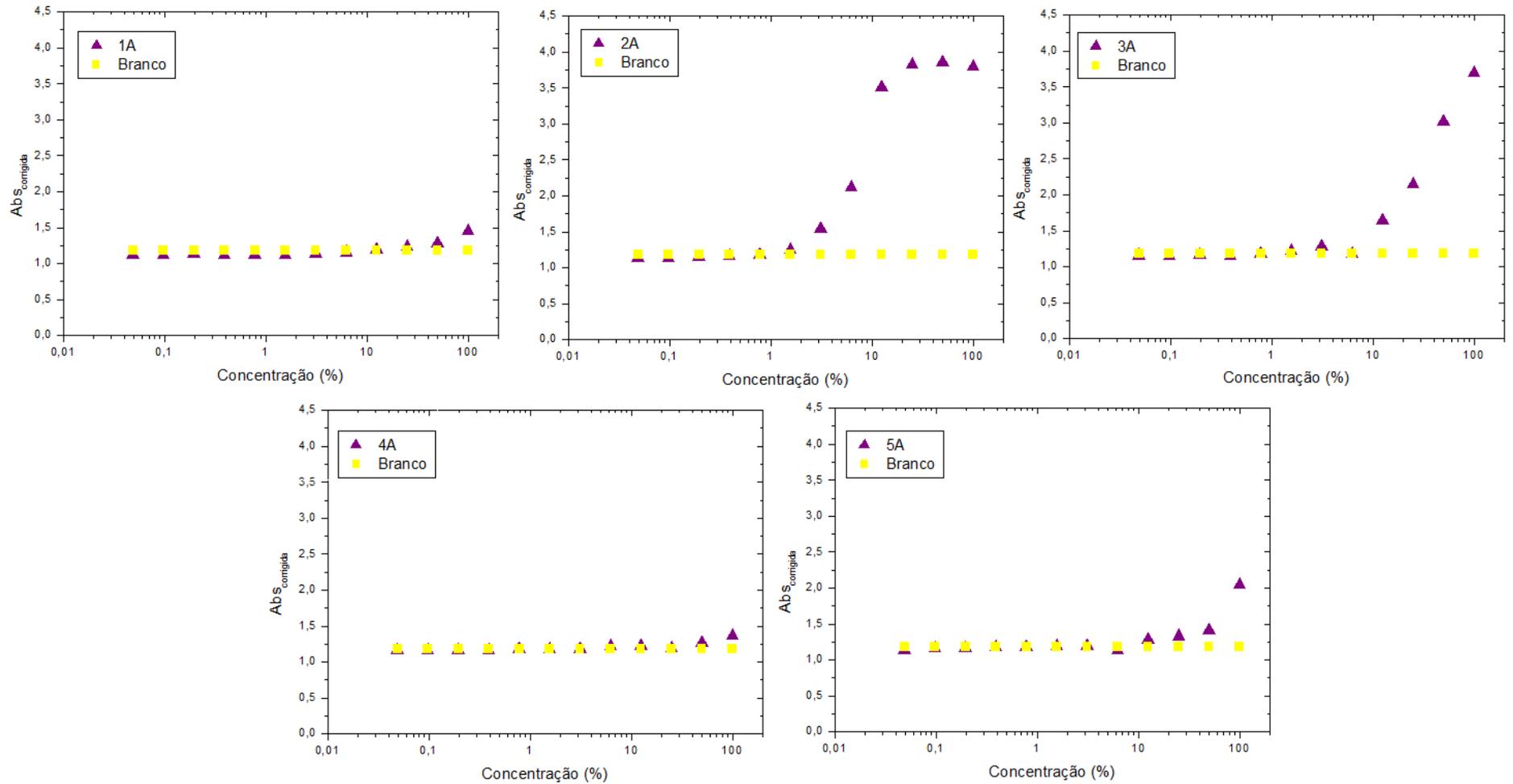
45 mL de meio mínimo

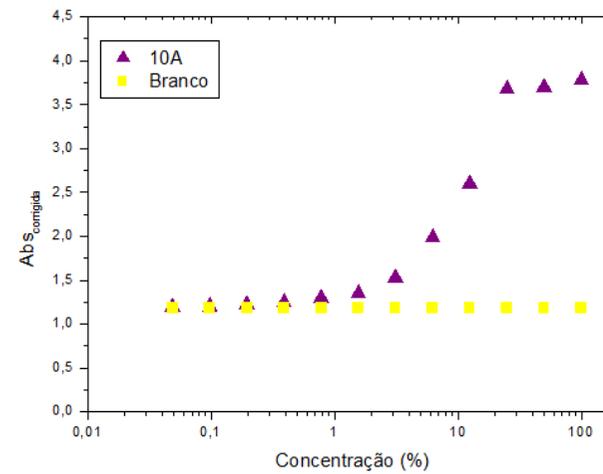
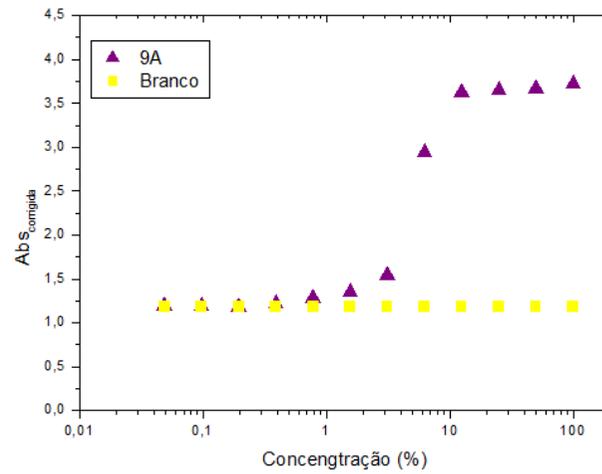
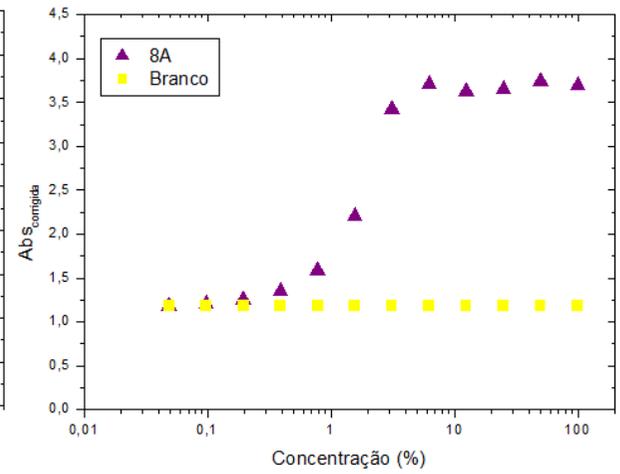
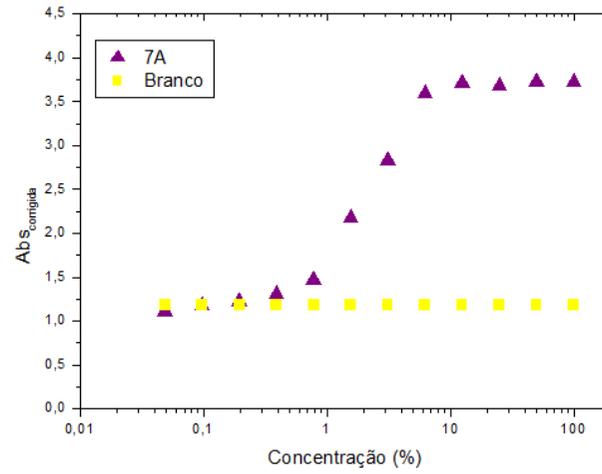
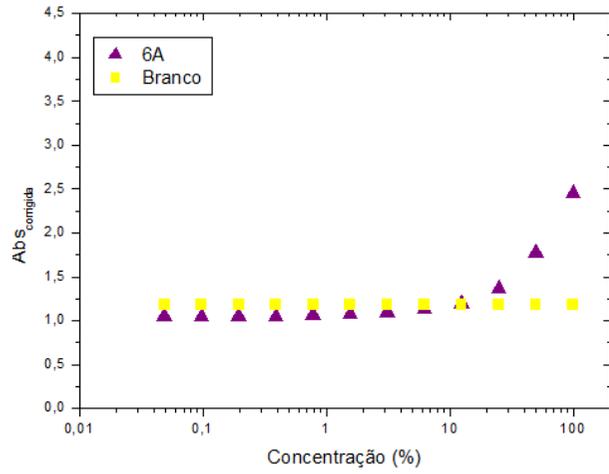
O meio mínimo, as soluções de glicose, ácido L-aspartico e L-treonina foram esterilizadas em frascos de vidro em autoclave a 121°C por 15 min.

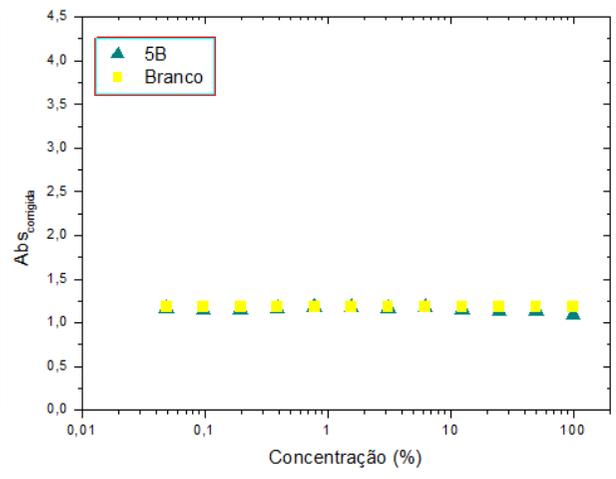
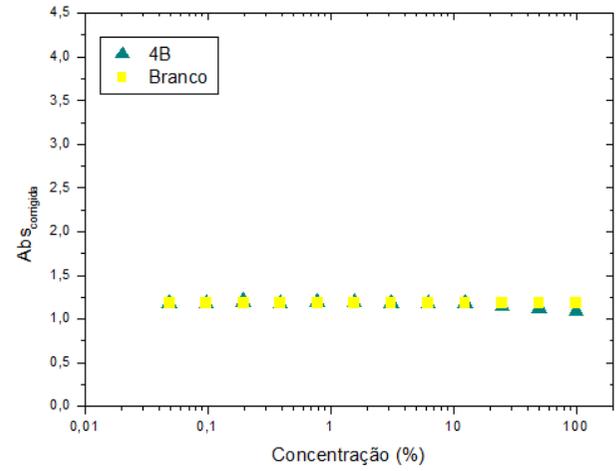
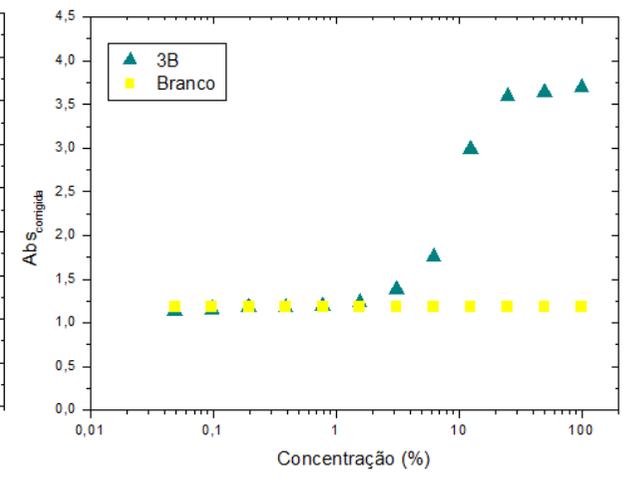
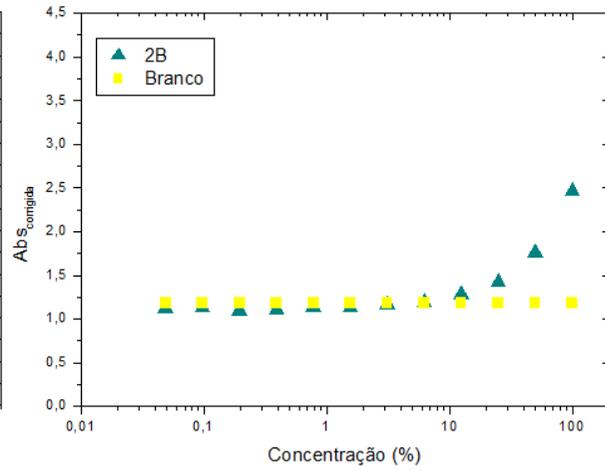
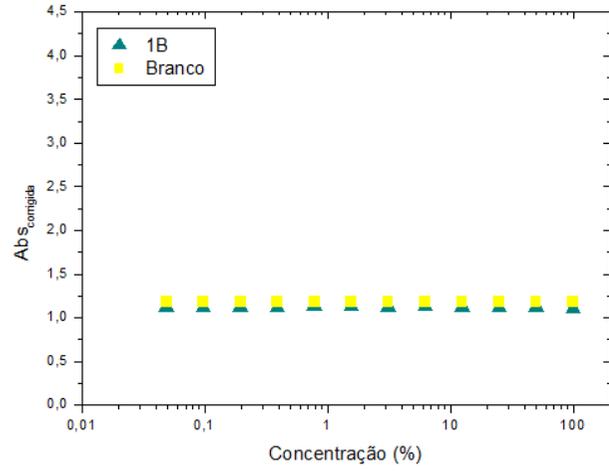
As soluções de sulfato de cobre (II) e de vitamina foram esterilizadas utilizando-se um kit de filtração estéril, com membrana de 0,2 μ m.

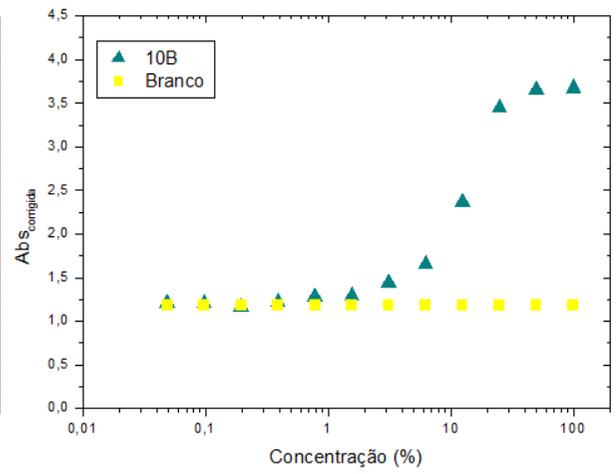
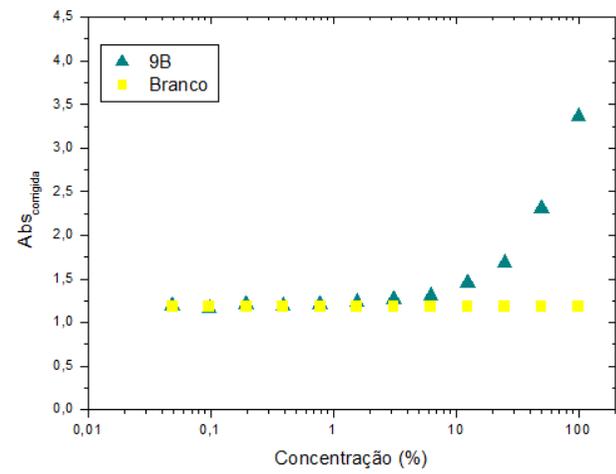
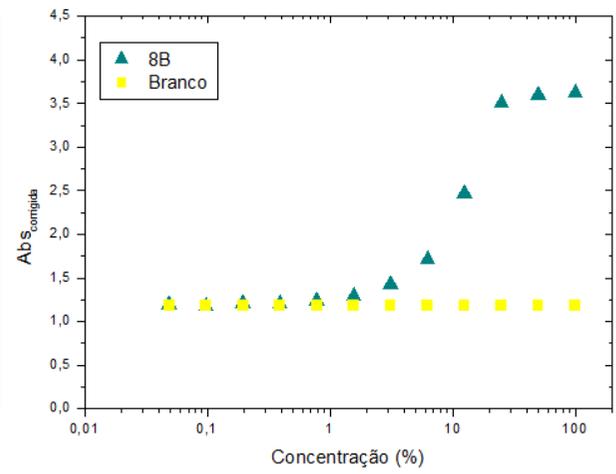
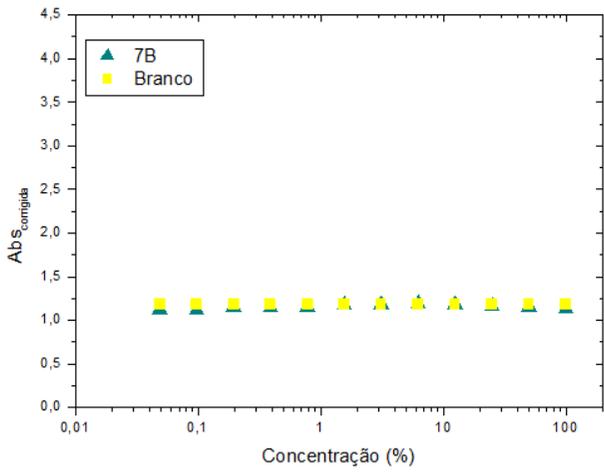
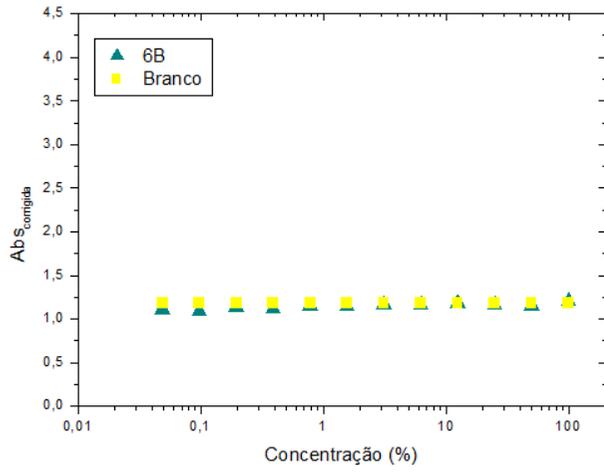
As soluções de L-treonina, vitamina e de CPRG foram armazenadas à temperatura de 4°C. Todas as demais foram armazenadas em temperatura ambiente.

ANEXO 2: Curvas dose-resposta das amostras de água bruta e potável do Rio Guandu

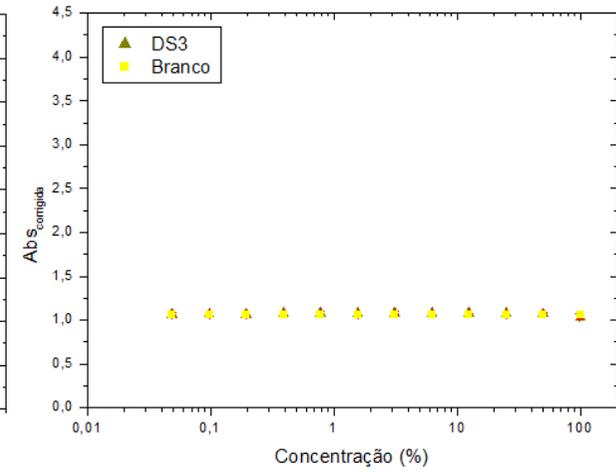
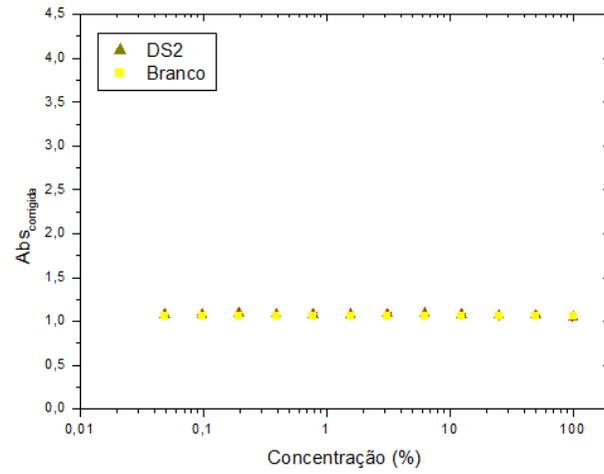
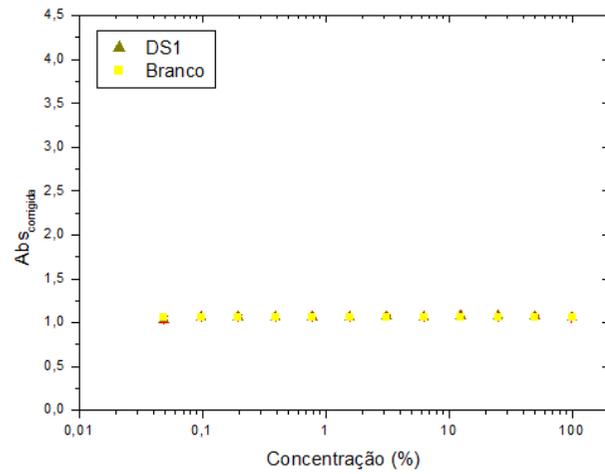
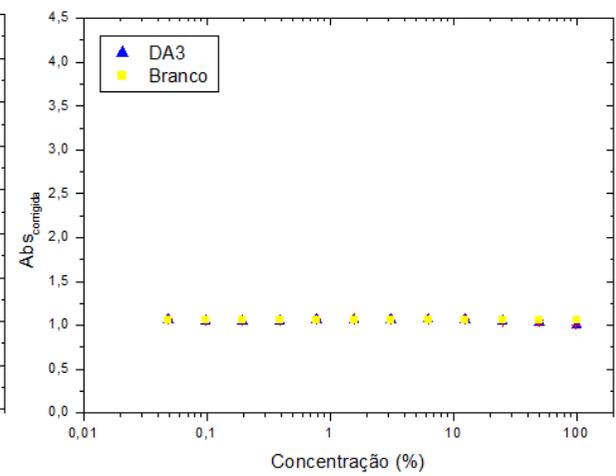
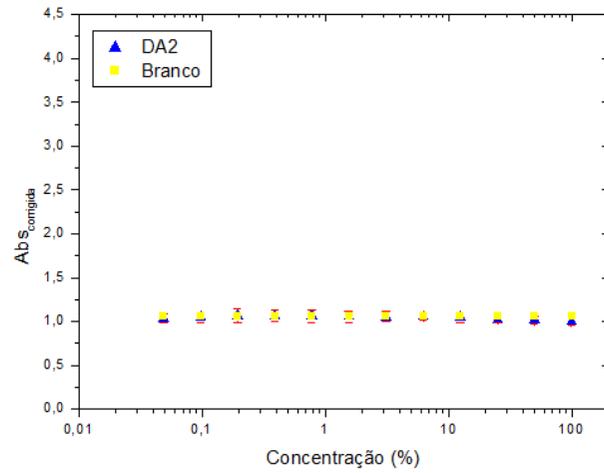
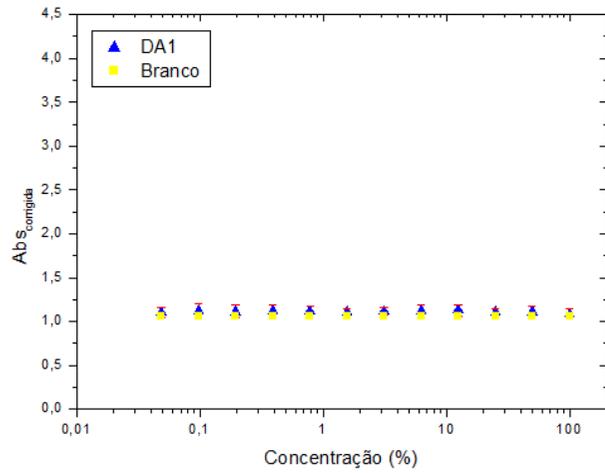


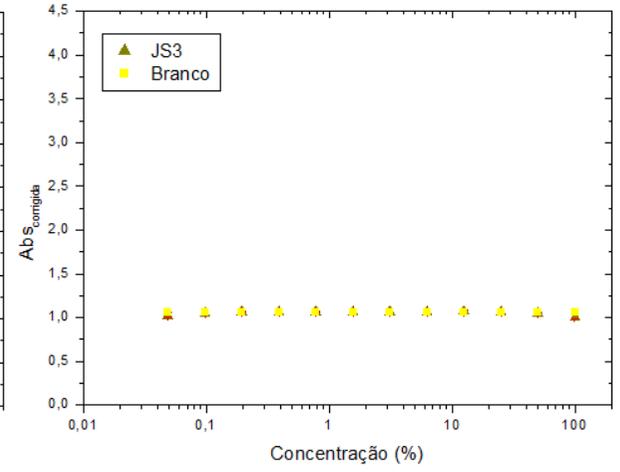
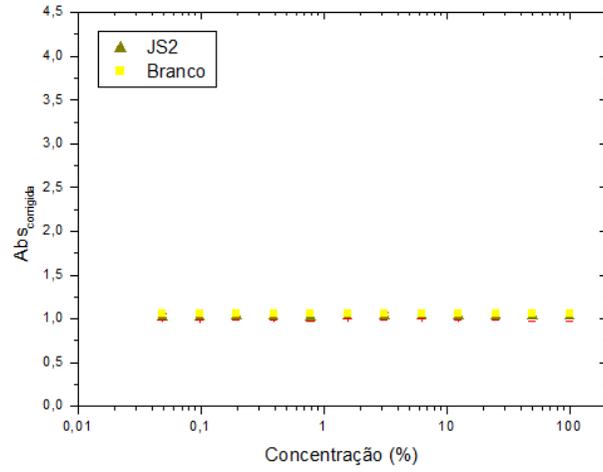
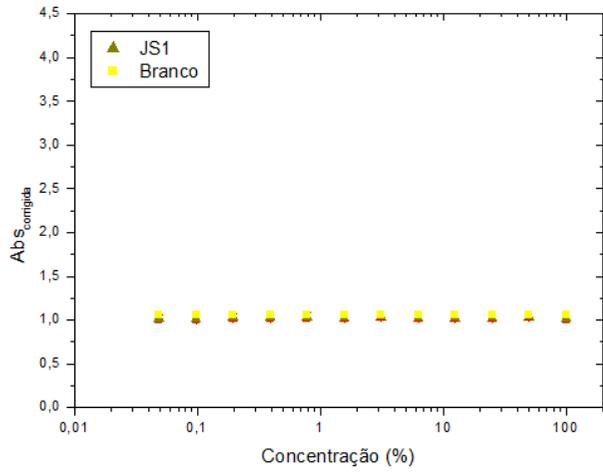
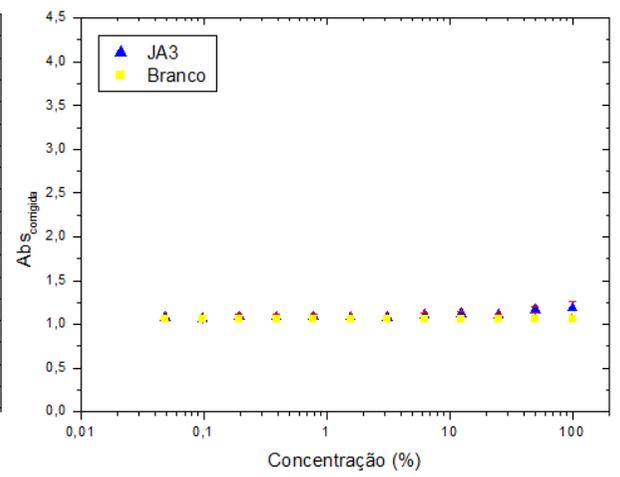
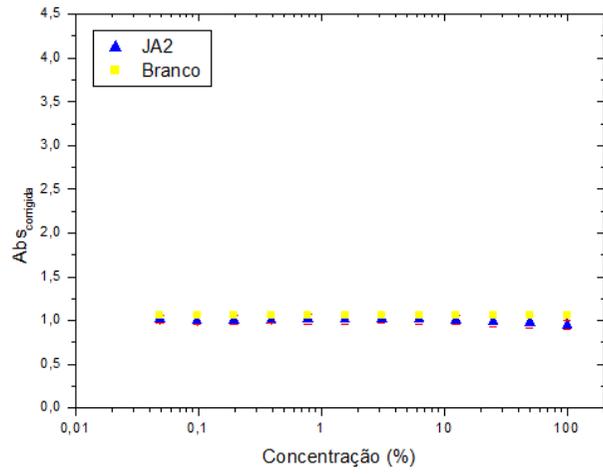
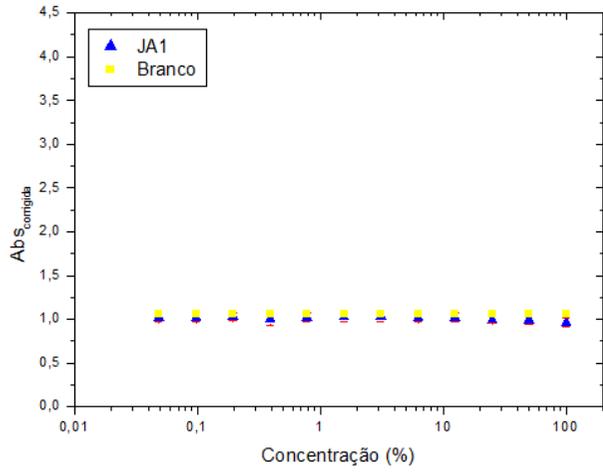


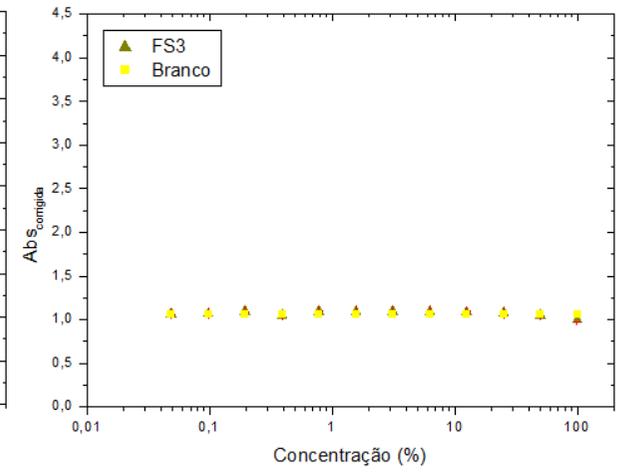
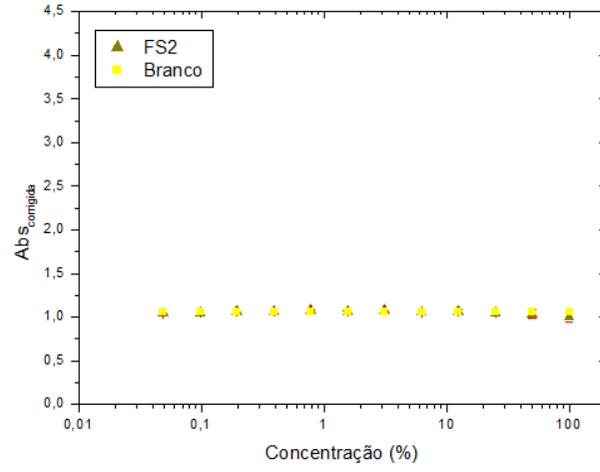
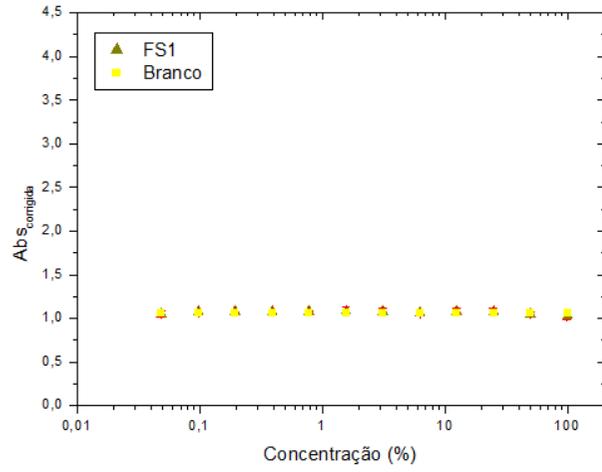
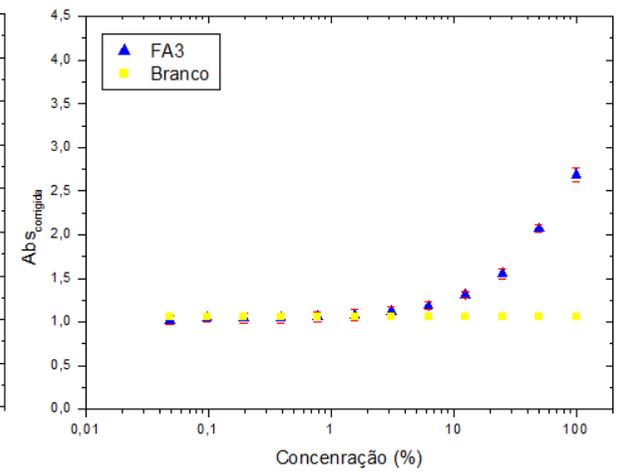
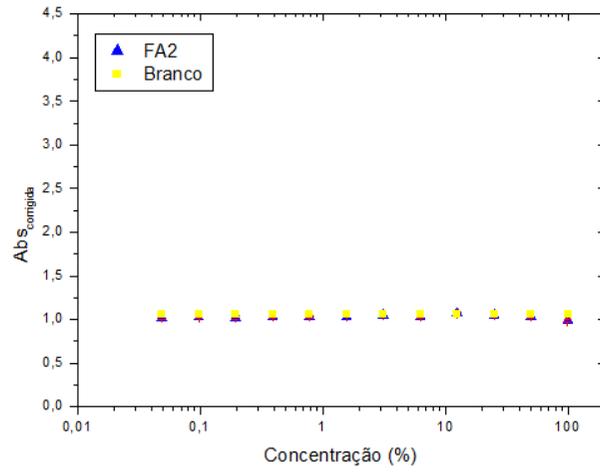
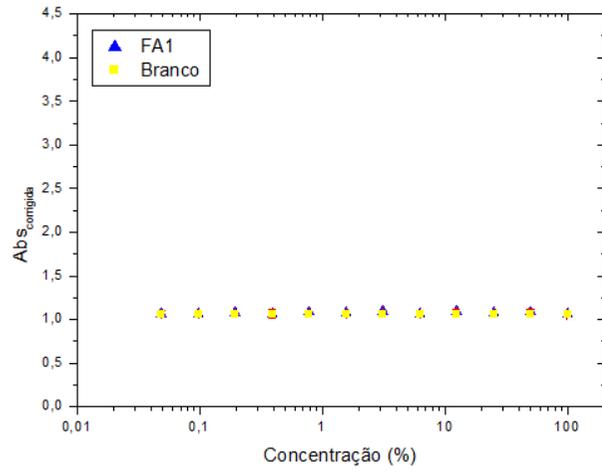




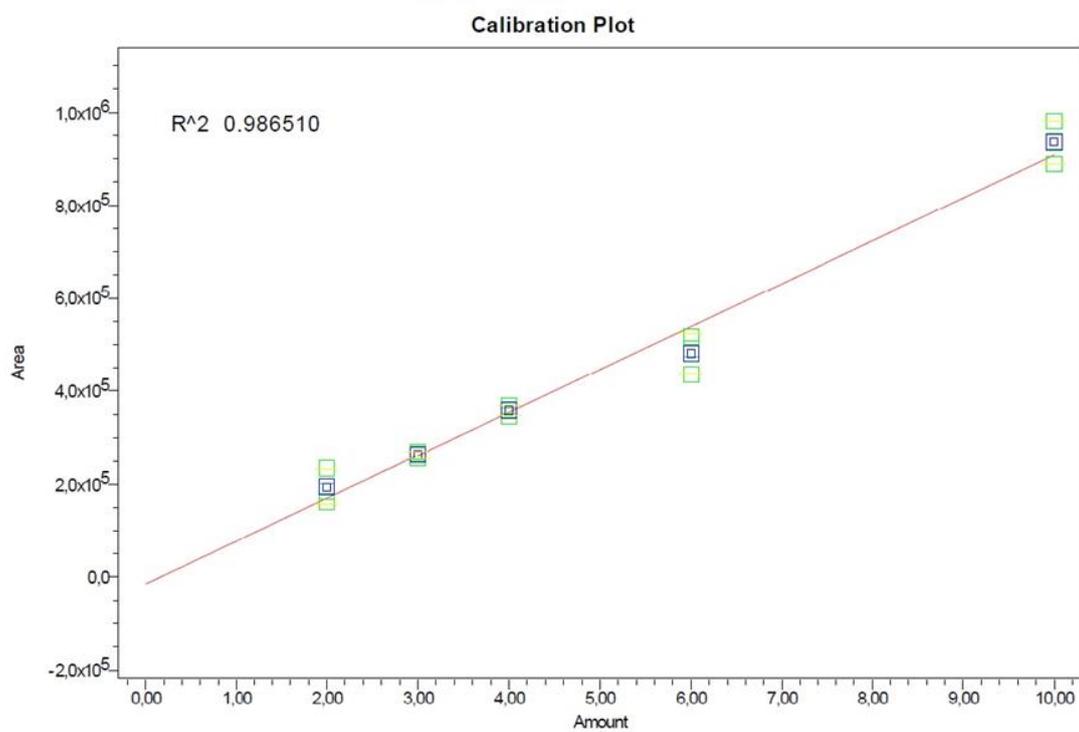
ANEXO 3: Curvas dose-resposta das médias com desvios das triplicatas mensais de amostras de água bruta e sedimento de cada ponto do Rio Santa Lucía, Uruguai





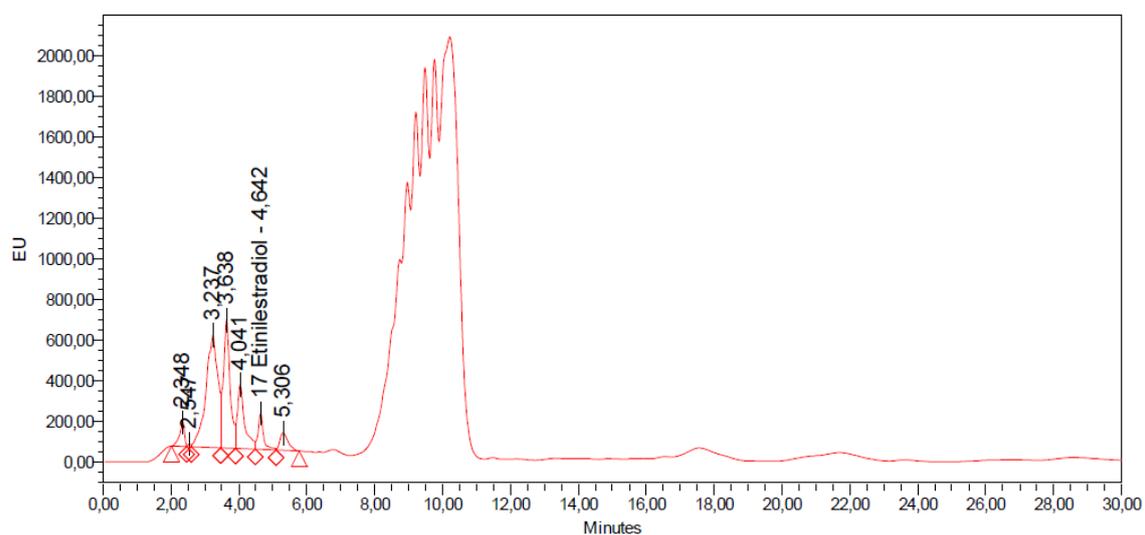
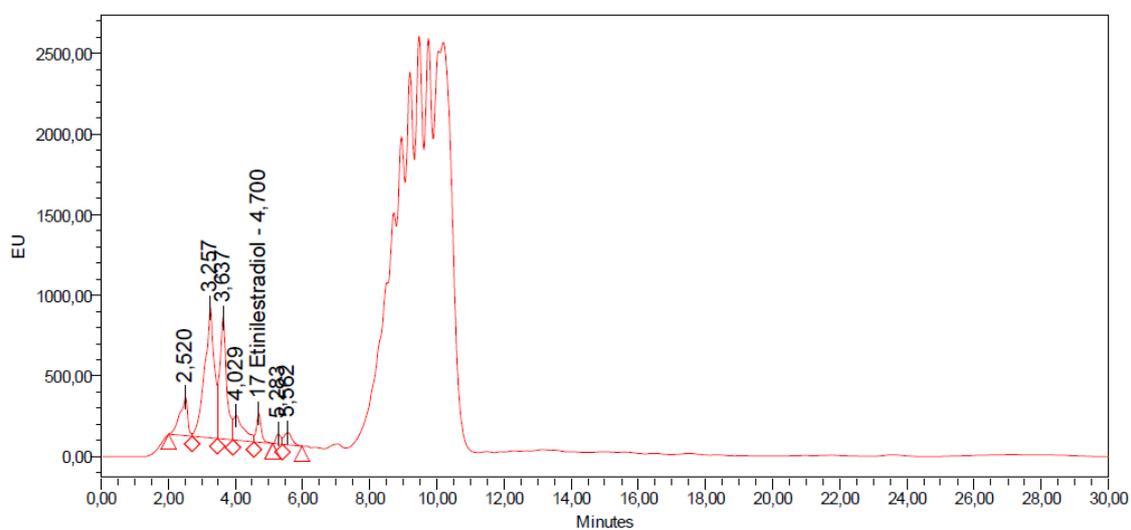
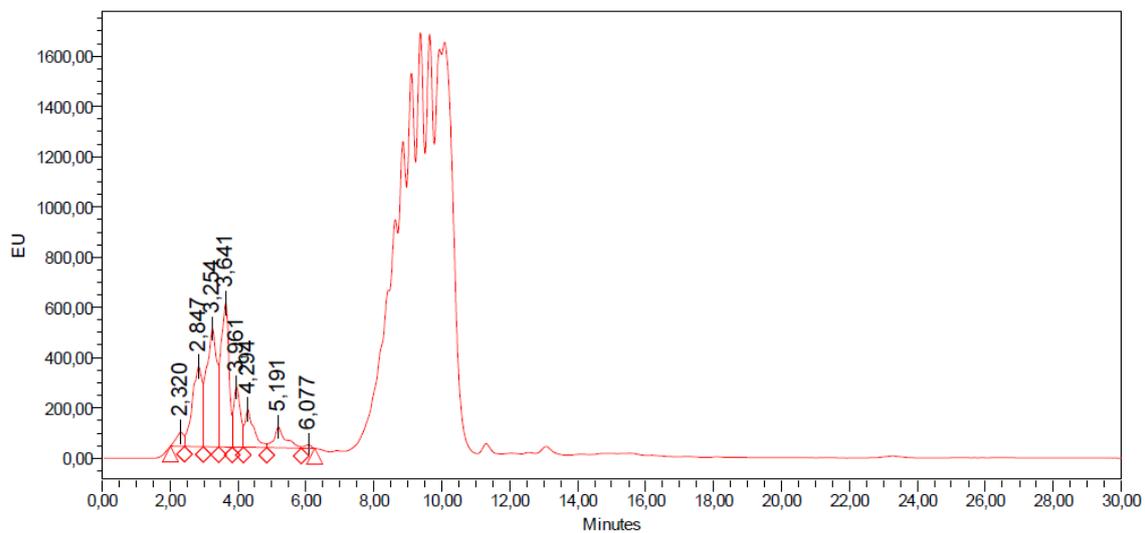


ANEXO 4: Curva analítica desenvolvida para a análise do composto 17 α -etinilestradiol por CLAE-FLU

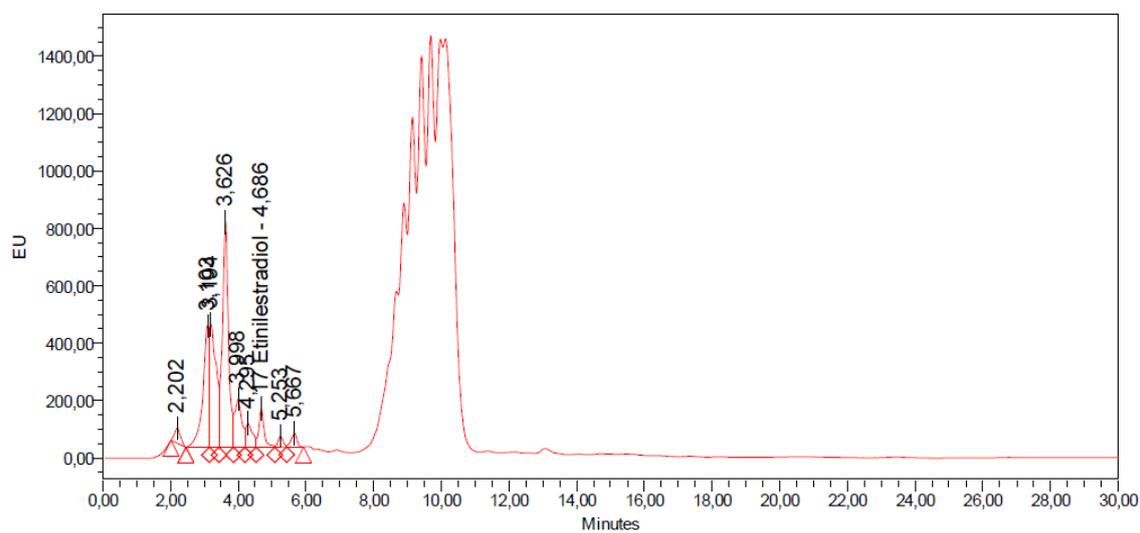
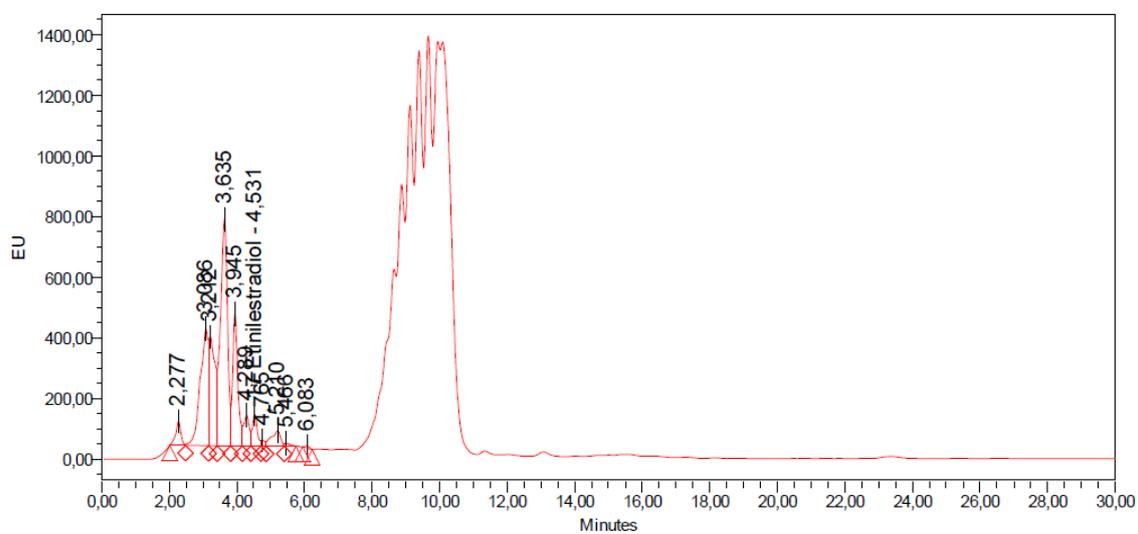
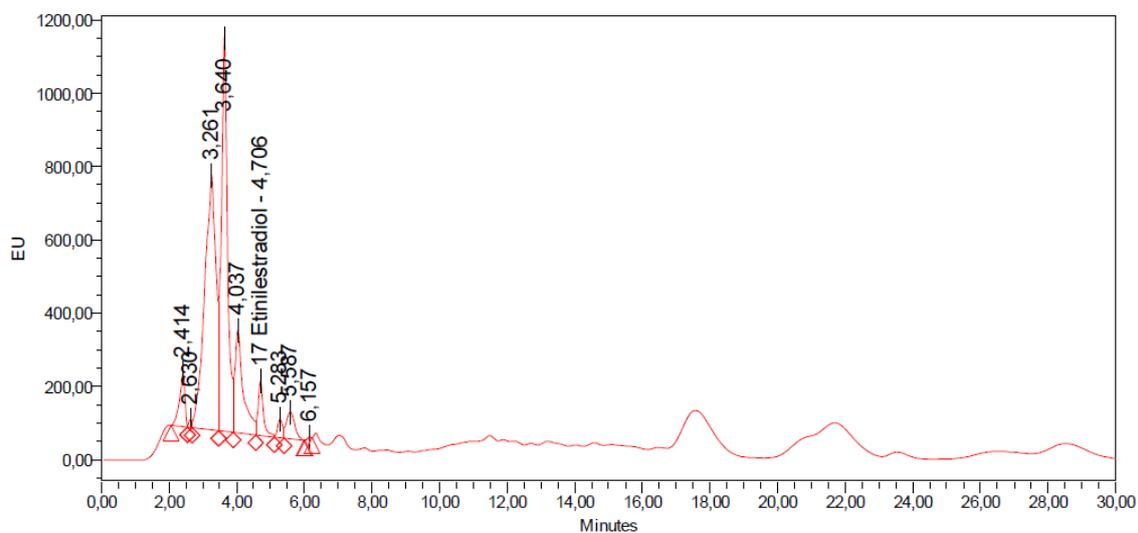


ANEXO 5: Cromatogramas das amostras submetidas à cromatografia líquida com detector de fluorescência

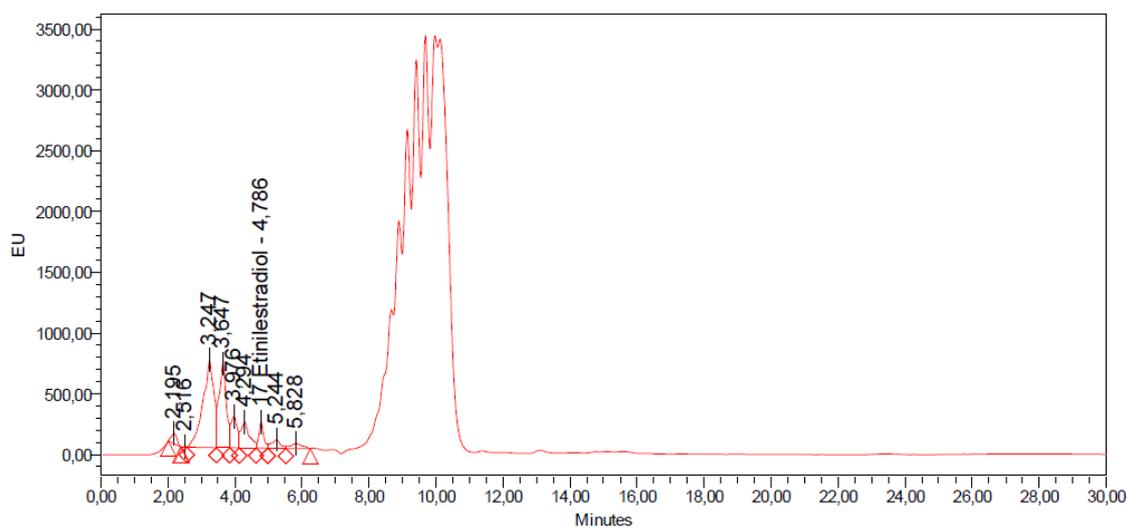
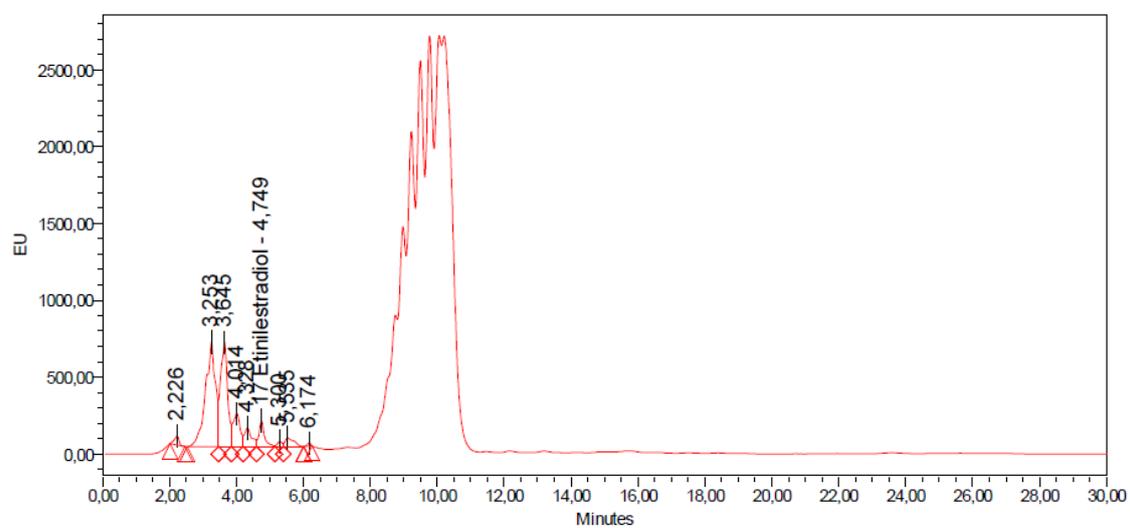
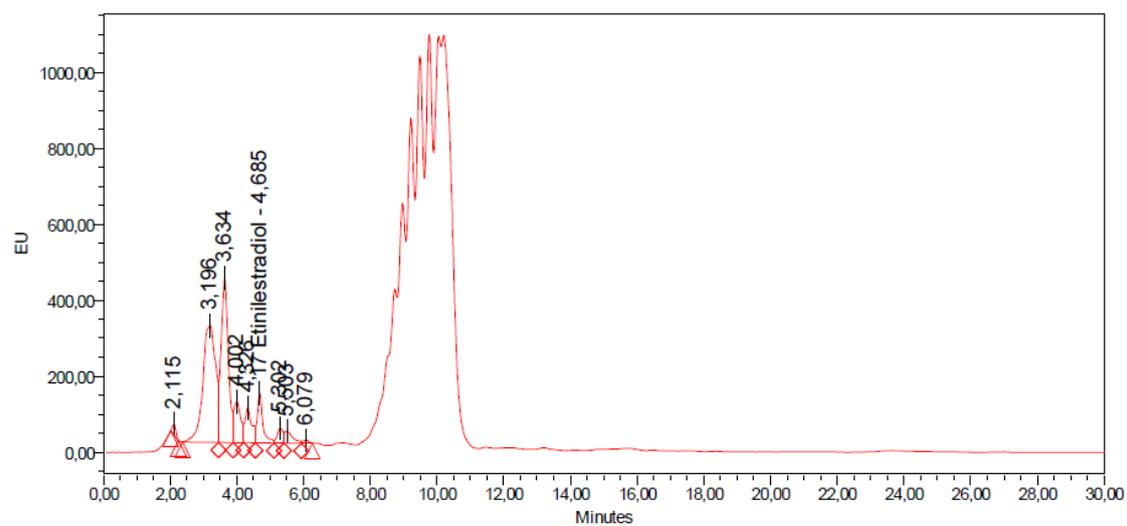
Amostras 1A, 2A, 3A, respectivamente.



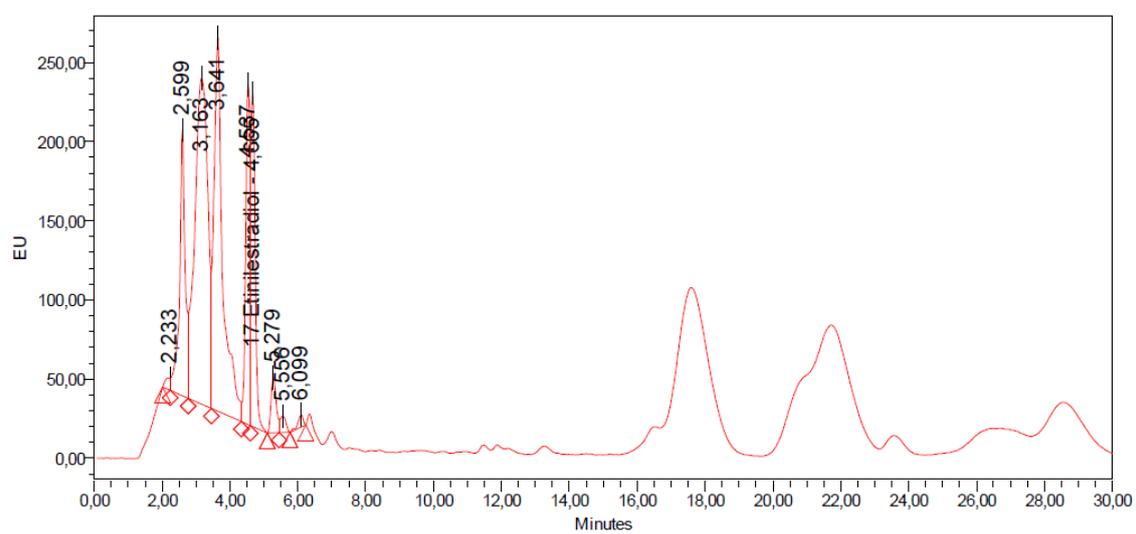
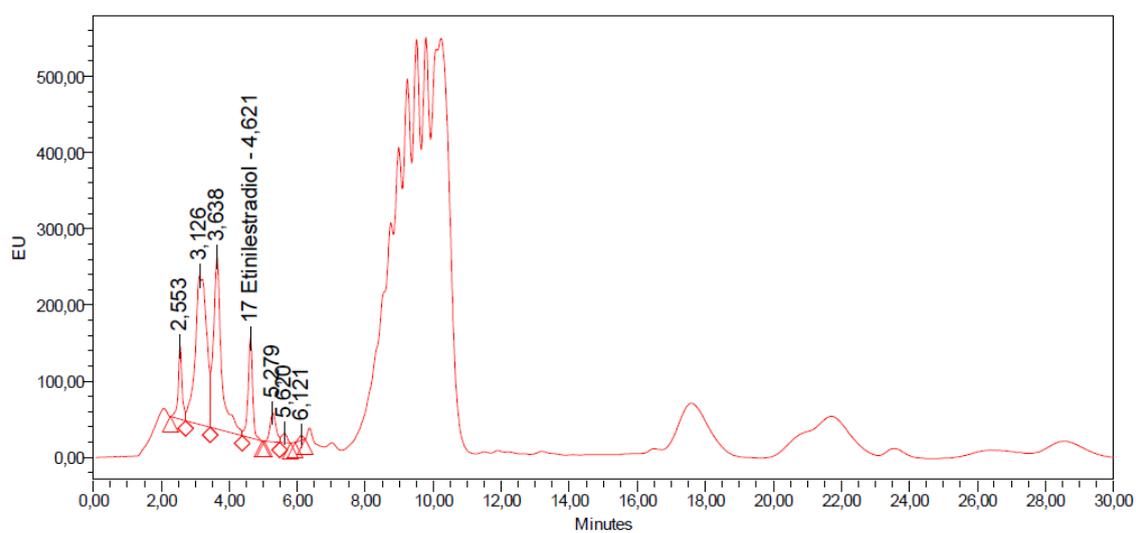
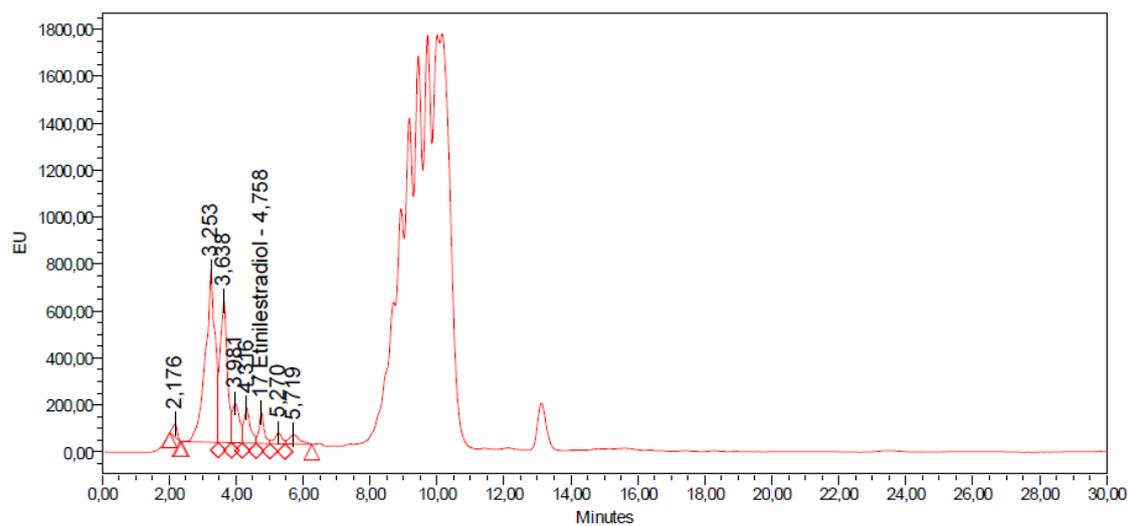
Amostras 4A, 5A, 6A, respectivamente.



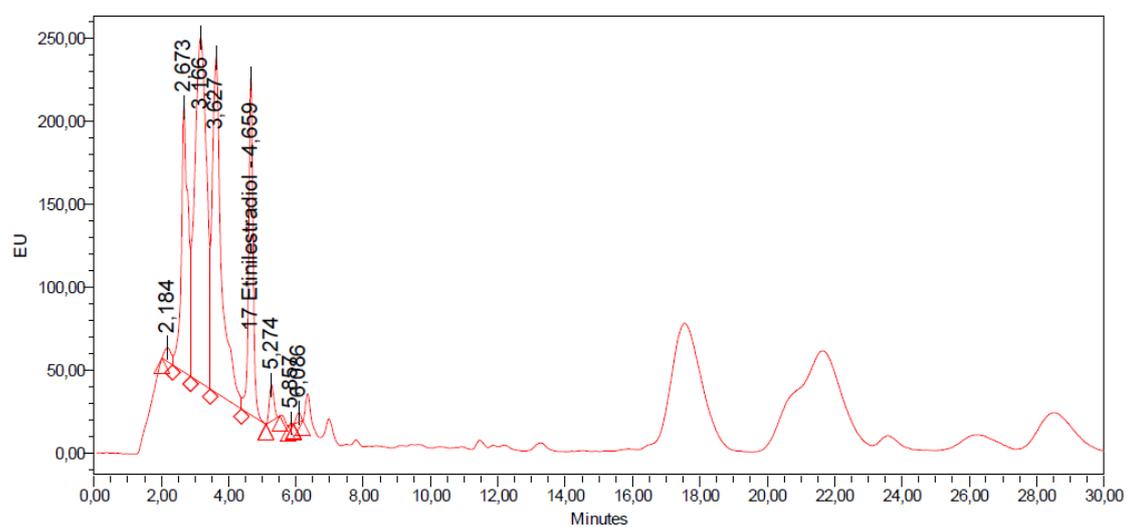
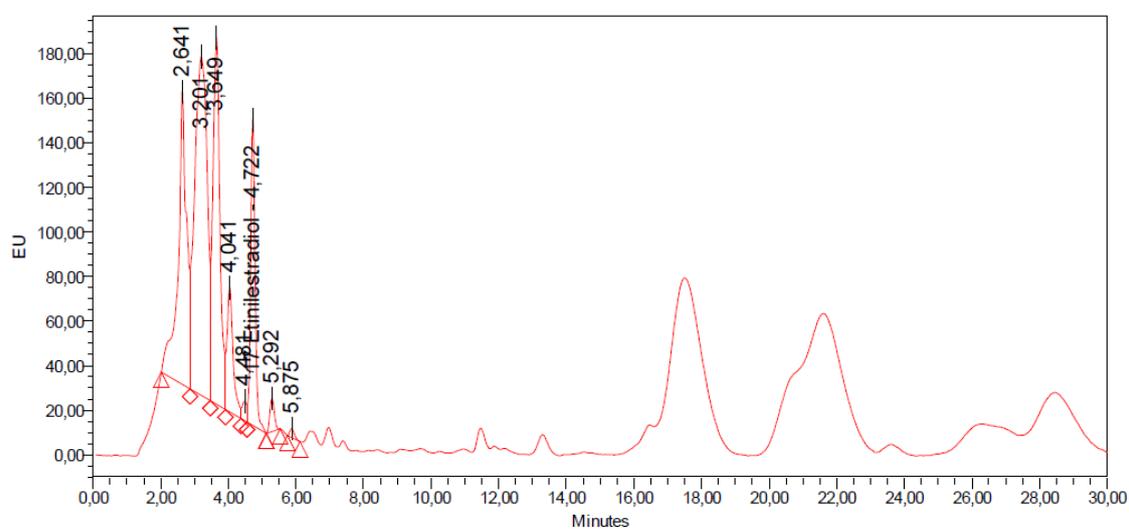
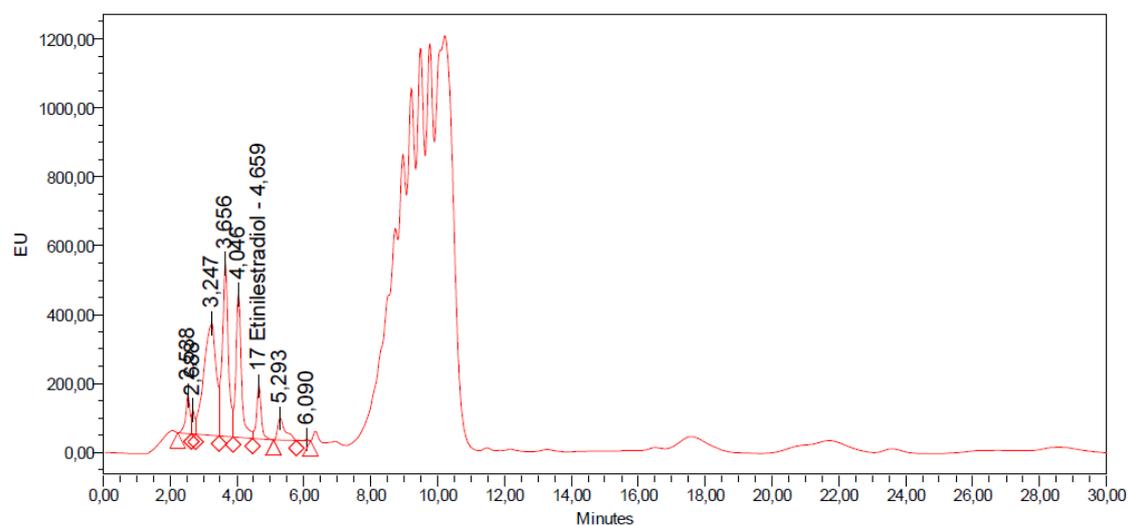
Amostras 7A, 8A, 9A, respectivamente.



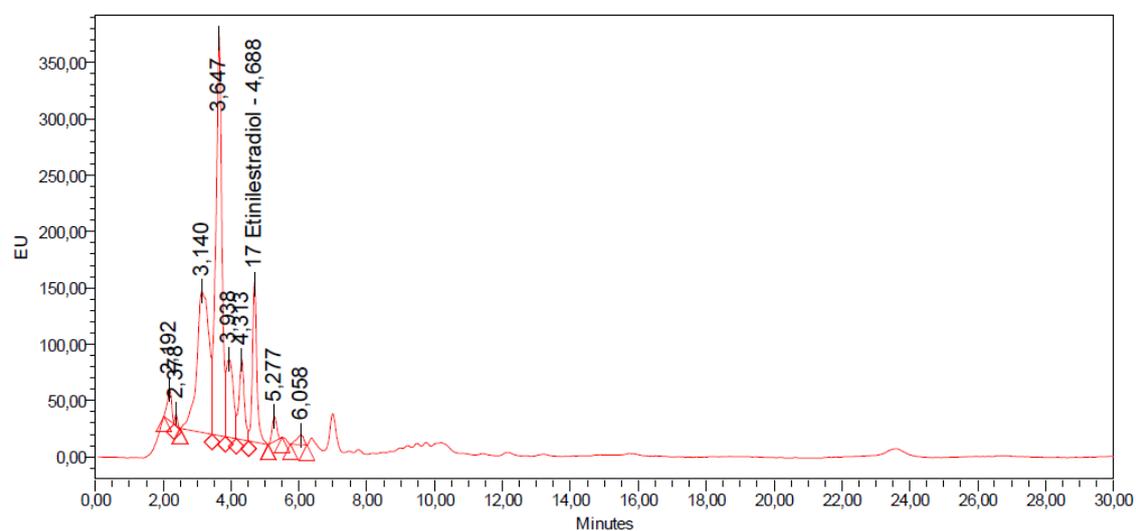
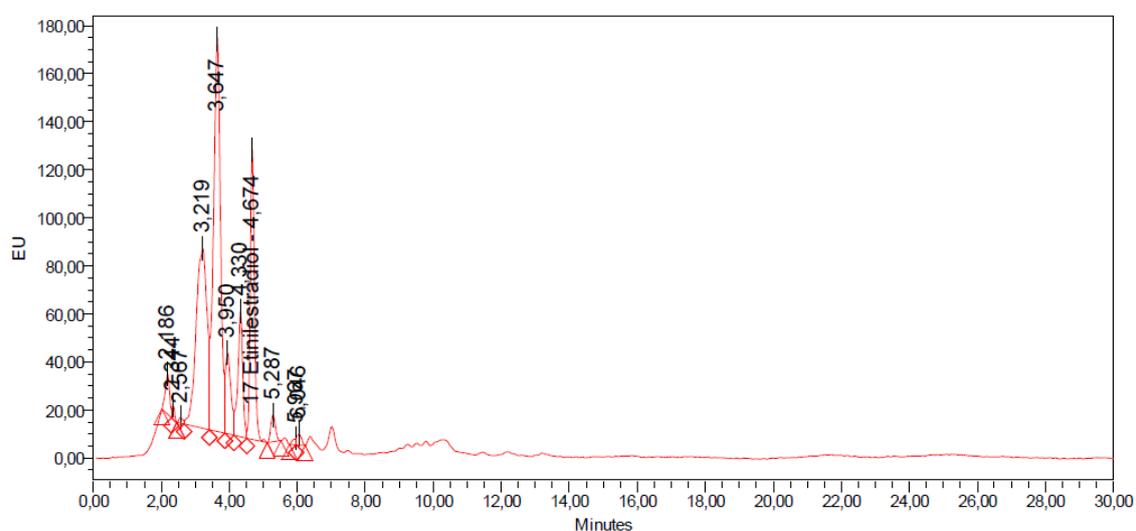
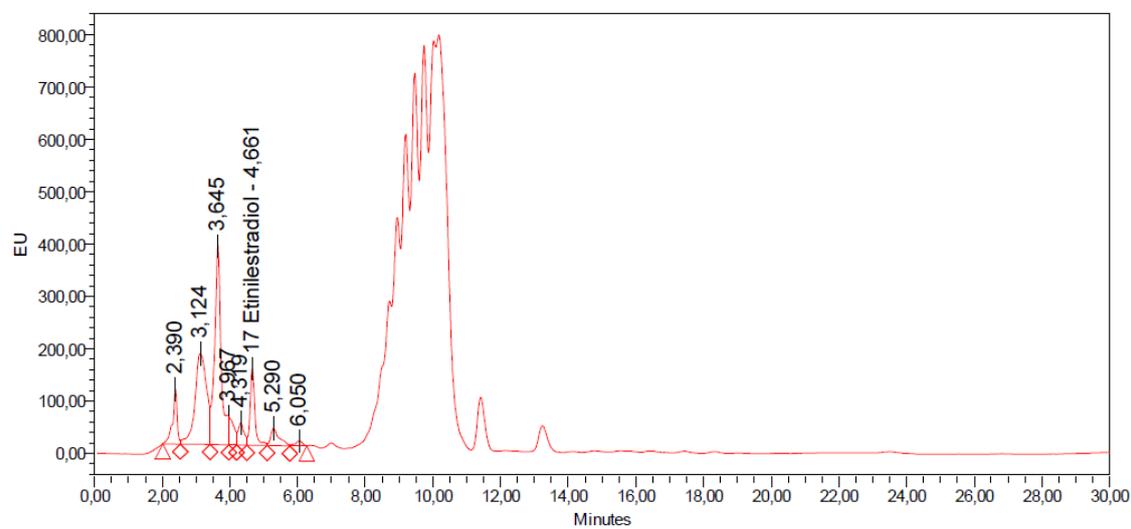
Amostras 10A, 1B, 2B, respectivamente.



Amostras 3B, 4B, 5B, respectivamente.



Amostras 6B, 7B, 8B, respectivamente.



Amostras 9B, 10B, respectivamente.

