**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS**

**CLORAÇÃO DE ÁGUA COM 17 β -ESTRADIOL E UTILIZAÇÃO DO
TESTE YES PARA AVALIAÇÃO DE ESTROGENICIDADE**

NATÁLIA FISCHER

- Versão corrigida -

SÃO CARLOS
2013

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **NATALIA FISCHER**.

Título da dissertação: "Cloração de água com 17 β -estradiol e utilização do teste YES para avaliação de estrogenicidade".

Data da defesa: 02/07/2013

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Dr. **Luiz Antonio Daniel - (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovado

Prof^a. Dr^a. **Eny Maria Vieira**
(Instituto de Química de São Carlos/IQSC)

Aprovado

Prof^a. Dr^a. **Daniele Maia Bila**
(Universidade Estadual do Rio de Janeiro/UERJ)

APROVADO

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Prof. Titular **Edson Cezar Wendland**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Denis Vinicius Coury**

6210833
Serviço de Pós-Graduação
Instituto de Física de São Carlos
2013

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS**

NATÁLIA FISCHER

**CLORAÇÃO DE ÁGUA COM 17 β -ESTRADIOL E UTILIZAÇÃO DO
TESTE YES PARA AVALIAÇÃO DE ESTROGENICIDADE**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Daniel

**SÃO CARLOS
2013**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

529c Fischer, Natália
Cloração de água com 17B-estradiol e utilização do
testeYES para avaliação de estrogenicidade / Natália
Fischer; orientador Prof Luiz Antonio Daniel. São
Carlos, 2013.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento --
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de
São Paulo, 2013.

1. 17B-estradiol. 2. Água. 3. Cloro. 4.
Estrogenicidade. 5. Teste YES. I. Título.

DEDICATÓRIA

À minha família e a
todos que sempre
estiveram presentes.

AGRADECIMENTOS

À toda minha família, especialmente meu pai José Tadeu, minha mãe Iara e meu irmão Fernando, sem os quais nada seria possível. Obrigada por sempre terem me apoiado, nunca duvidado e sempre terem estado junto de mim.

Ao Prof. Luiz Daniel, pela orientação de tantos anos. Pela paciência e disponibilidade, e por sempre ter confiado e dado meios e espaço para que eu pudesse crescer.

À Profa. Eny Vieira. Agradeço por toda a ajuda com as sugestões na qualificação, disponibilização do laboratório e apoio nas recomendações necessárias para o doutorado.

À Profa. Daniele Bila, por toda a inestimável ajuda. Muito obrigada por ter me acolhido na UERJ, ensinado o teste YES e ajudado em momentos em que nada funcionava. Este trabalho não teria sido possível sem sua ajuda.

Ao Sidnei, técnico do Laboratório de Engenharia Sanitária da UERJ, por toda a ajuda nas vezes em que estive na UERJ. Igualmente ao Raphael e à Luciana do IQSC. À Profa. Lyda Sabogal, pelas sugestões no exame de qualificação.

Aos amigos “latarianos”: Lucas Marcon, Raphael Medeiros, Teresa Sasaki, Gabriel Sacchi, Andressa Bichara, Karen Souza, Gabriela Laila, Eloá Pelegrino e Marcos Scaff. À técnica do Latar, Maria Teresa Hoffman, pela ajuda nas análises e todo apoio no laboratório.

Às amigas de longa data Bruna Turino, Juliana Pizano e Lorine Arias Bonifácio, por tantos anos de amizade, apoio, colo e saudades. Principalmente por terem me ensinado que: “Muitas vezes temos que crescer separados, para continuar crescendo juntos”. Não me imagino sem vocês.

À amiga Priscila Marconi, por tudo. Por todo o acolhimento, momentos de alegria, companhia e apoio em todas as horas.

Aos amigos da querida Amb3turma: Eduardo Penteado (além de amigo, família), Marcus Vinícius, Natália Heloína, André Camargo, Andrea Braun, Thays Ferreira, Renata Amaral, Giovanna Hamada (e a pequena Ester), Thiago Galvão, Amanda Tavares, Mariana Kasemodel, Cláudia Rotta e tantos outros. Que possamos ainda ter muitos encontros.

Aos amigos do mestrado: Rafaella Campos, Jaqueline Sakamoto, Guilherme Vuitik, Thyago Rodrigues, Davi Andrade, Nayara Falanca, Rodrigo de Almeida e Maria Gamboa, pela companhia.

Ao amigo Antônio Meira, pelo que foi.

À todos que não estão citados aqui, mas que fizeram e continuarão a fazer parte dos encontros e desencontros da vida.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

FISCHER, N. Cloração de água com 17 β -estradiol e utilização do teste YES para avaliação de estrogenicidade. 2013. 115 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

Recentemente, a identificação de substâncias consideradas desreguladores endócrinos em meios aquáticos e a associação destas substâncias com alterações nas comunidades aquáticas, como dificuldades de reprodução em populações de peixes, mostra a importância da pesquisa de tratamentos mais eficientes para a remoção destas substância, bem como uma compreensão maior dos mecanismos de sua oxidação. Dentre estas substâncias de interesse, destacam-se alguns fármacos e hormônios naturais e sintéticos, como é o caso do 17 β -estradiol. A oxidação com cloro é uma alternativa eficiente para a remoção destas substâncias, mas a formação de subprodutos da oxidação gera preocupações quanto ao risco destes compostos continuarem a apresentar atividade estrogênica, e portanto riscos à comunidade aquática. A proposta desta pesquisa é estudar a oxidação com cloro do 17 β -estradiol em água de abastecimento, com foco na avaliação da remoção da estrogenicidade utilizando o teste YES. A escolha pela cloração foi feita visto que este é o tratamento mais difundido no Brasil, assim as concentrações e tempos de contato estudados também foram definidos de forma a corresponder àqueles utilizados regularmente em Estações de Tratamento de Água.

Palavras-chave: 17 β -estradiol, água, cloro, estrogenicidade, teste YES

ABSTRACT

FISCHER, N. **Chlorination of water with 17 β -estradiol and application of the YES test for estrogenicity assessment.** 2013. 115 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

In the past years, the identification of some substances classified as endocrine disruptors in water environments has been associated with alterations in these environments dynamics, such as reproduction difficulties in fish populations. Such problems show the need for more efficient removal techniques of these substances and a greater understanding of the mechanisms involved in their oxidation. Among these substances are some pharmaceuticals, natural and synthetic hormones, such as 17 β -estradiol. Chlorination is an efficient treatment alternative for removing these substances. However the formation of chlorination by-products is a concerning risk of this treatment, since some by-products may still possess estrogenic activity, therefore continuing to offer risks to the water environment. The aim of this research is to study the 17 β -estradiol chlorination in drinking water, with emphasis on estrogenicity removal using the YES test. Chlorination was chosen since this is the most used oxidation process in Brazil. Likewise the chlorine concentrations and contact times used in this study were chosen to correspond to those usually used in Water Treatment Plants.

Keywords: 17 β -estradiol, water, chlorine, estrogenicity, YES test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do 17 β -estradiol (ALUM et al, 2004).....	24
Figura 2 – Placa de 96 poços com o resultado do teste YES após o período de incubação. Fonte: Routledge e Sumpter (1996).	32
Figura 3 – Curva dose-resposta para o teste YES, apresentando os valores de absorbância do meio plotados contra o log da concentração de 17 β -estradiol. Fonte: Routledge e Sumpter (1996).	32
Figura 4 – Relação entre atividade estrogênica e inibição do crescimento da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , conforme apresentado por Beck et al (2006).	37
Figura 5 – Placa com as amostras após o período de incubação	54
Figura 6 – Gráfico retirado de Alexander et al (1999), ilustrando os pontos utilizados para o cálculo do EC ₅₀	56
Figura 7 – Placa com amostras do teste YES com as linhas de brancos contaminadas. Linhas A e C: curva de 17 β -estradiol, linhas E e G: amostra, linhas B, D, F e H: branco (etanol).	61
Figura 8 – Placa com o teste YES realizado em linhas alternadas. As linhas A e E correspondem à curva de 17 β -estradiol e as linhas C e G ao branco (etanol).....	62
Figura 9 – Placa com o teste YES realizado em linhas alternadas. As linhas A, C, E e G correspondem à curva de 17 β -estradiol.....	62
Figura 10 - Placa com o teste YES realizado em linhas alternadas. As linhas A, C, E e G correspondem ao branco (etanol).	62
Figura 11 – Curva padrão de 17 β -estradiol, referente ao teste YES apresentado na Figura 7.	63
Figura 12 – Meio de análise incubado sem amostra. Na placa à direita, as linhas E e F correspondem ao meio restante em um tubo falcon e as linhas G e H a outro tubo falcon. Na placa à esquerda as linhas C e D correspondem ao restante de um tubo e F e G a outro.	64
Figura 13 - Teste YES após 54 horas de incubação. À esquerda, as linhas A, C, E e G correspondem à curva de 17 β -estradiol. À direita, as mesmas linhas correspondem ao branco (etanol).....	65
Figura 14 – Curva de 17 β -estradiol referente ao teste YES apresentado na Figura 13.....	66
Figura 15 – Teste YES realizado com a concentração de CPRG de 10 mgL ⁻¹ . As linhas A, C, E e F correspondem à curva de 17 β -estradiol após 72 h de incubação.	68
Figura 16 – Teste YES realizado no Latar com o meio de análise do LES. A placa à esquerda corresponde à curva de 17 β -estradiol e a placa à direita ao branco (etanol).....	70
Figura 17 - Teste YES realizado no Latar com o meio de análise do LES. As linhas A, C, E e G corresponde à curva de 17 β -estradiol e as linhas B, D, F e H ao branco (etanol).....	70
Figura 18 – Curva de 17 β -estradiol referente à Figura 16, resultado do teste YES realizado no Latar utilizando o meio de análise do LES.	71
Figura 19 – Placa com resultado para a curva de 17 β -estradiol (linhas A e C).	76
Figura 20 – Curva padrão de 17 β -estradiol (resultados referentes à Figura 19).	76
Figura 21 – Curvas dose-resposta para as amostras de água do poço antes e após a cloração no Ensaio 1.....	78

Figura 22 - Curvas dose-resposta para as amostras de água do poço antes e após a cloração no Ensaio 1.	79
Figura 23 – Placa com o resultado da amostra de água do poço com 17 β -estradiol para o Ensaio 1. As linhas E e G são correspondentes à esta amostra.	80
Figura 24 – Curvas dose-resposta para as amostras de água do poço antes e após a cloração no Ensaio 2.	83
Figura 25 – Resultado do teste YES do ensaio 2. As linhas E e G da placa à esquerda correspondem à amostra de água com 17 β -estradiol e as linhas E e G da placa à direita correspondem à amostra de água com 17 β -estradiol oxidada.	84
Figura 26 – Curva dose-resposta para as amostras de água com 17 β -estradiol antes e após a oxidação.	85
Figura 27 - Curvas dose-resposta para as amostras de água do poço antes e após a cloração no Ensaio 3.	87
Figura 28 - Curvas dose-resposta para as amostras de água com 17 β -estradiol antes e após a cloração no Ensaio 3.	88
Figura 29 – Placas com os resultados do teste YES para a figura 28..As linhas A e C da placa à esquerda correspondem à amostra extraída de água com E2 e as linhas E e G da placa à direita correspondem à amostra de água com E2 oxidada.	88
Figura 30 - Curvas dose-resposta para as amostras de água do poço antes e após a cloração no Ensaio 4.	90
Figura 31 - Curvas dose-resposta para as amostras de água com 17 β -estradiol antes e após a cloração no Ensaio 4.	90
Figura 32 – Curvas dose-resposta para as amostras de água do poço antes e após a cloração no Ensaio 5.	92
Figura 33 - Curvas dose-resposta para as amostras de água do poço antes e após a cloração no Ensaio 5.	93
Figura 34 – Curvas dose-resposta para o Ensaio 1.	95
Figura 35 – Curvas dose-resposta para o Ensaio 2.	96
Figura 36 – Curvas dose-resposta para o Ensaio 3.	96
Figura 37 - Curvas dose-resposta para o Ensaio 4.	97
Figura 38 - Curvas dose-resposta para o Ensaio 5.	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Substâncias consideradas desreguladores endócrinos (WESTERHOFF et al, 2005).	23
Tabela 2 – Métodos utilizados para a caracterização físico-química da água de estudo.....	41
Tabela 3 – Ensaio de oxidação com cloro	44
Tabela 4 – Caracterização físico-química da água do poço antes dos ensaios de cloração.	72
Tabela 5 – Caracterização físico-química da água do poço após os ensaios de cloração.	73
Tabela 6 – Concentração de cloro residual para os ensaios realizados.	74
Tabela 7 - Concentração de cloro residual para as amostras controle nos ensaios realizados.	75
Tabela 8 – Estimativa da toxicidade para as amostras com inibição do crescimento da levedura do Ensaio 1.	81
Tabela 9 – Valores de EC ₅₀ e potência relativa para o Ensaio 1.	82
Tabela 10 – Valores de EC ₅₀ e potência relativa para o Ensaio 2.	84
Tabela 11 – Estimativa da toxicidade para as amostras com inibição do crescimento da levedura do Ensaio 2.	85
Tabela 12 – Estimativa da toxicidade para as amostras com inibição do crescimento da levedura do Ensaio 3.	89
Tabela 13 - Estimativa da toxicidade para as amostras com inibição do crescimento da levedura do Ensaio 4.	91
Tabela 14 - Valores de EC ₅₀ e potência relativa para o Ensaio 4.	91
Tabela 15 - Estimativa da toxicidade para as amostras com inibição do crescimento da levedura do Ensaio 5.	93
Tabela 16 – Valores de EC ₅₀ e potência relativa para o Ensaio 5.	94

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 Desreguladores endócrinos e sua presença no meio ambiente	22
3.2 Detecção e remoção de desreguladores endócrinos e atividade estrogênica em água, utilizando a cloração	26
3.3 Teste YES	30
3.4 Problemas associados ao teste YES	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Análises Físico-Químicas	40
4.2 Análise de cloro por titulometria	41
4.3 Ensaio de oxidação com cloro	42
4.4 Metodologia de extração	44
4.5 Teste YES (Yeast Estrogen Screen)	45
4.5.1 Preparo das soluções	46
4.5.1.1 Meio mínimo	47
4.5.1.2 Solução de vitamina	47
4.5.1.3 Solução de glucose	47
4.5.1.4 Solução de ácido L-aspartico	48
4.5.1.5 Solução de L-treonina	48
4.5.1.6 Solução de sulfato de cobre (II)	48
4.5.1.7 Solução de CPRG	49
4.5.1.8 Meio de cultivo	49
4.5.2 Cultivo da cepa	49
4.5.3 Procedimento do teste	50
4.5.3.1 Diluições das amostras	51
4.5.3.2 Diluições da curva padrão de 17 β -estradiol	51
4.5.3.3 Preparo do meio de análise	52
4.5.4 Preparo das placas de teste	54
4.5.5 Análise dos dados do teste YES	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1 Implementação do teste YES no LATAR	60
5.1.1 Problemas	60
5.1.2 Concentração de CPRG	67
5.1.3 Identificação das causas dos problemas com o teste YES	68

5.2	. Caracterização da água de estudo.....	72
5.3	. Ensaio de cloração – teste YES	73
5.3.1	Consumo de cloro.....	74
5.3.2	Curva padrão de 17 β -estradiol.....	75
5.3.3	Ensaio 1	78
5.3.4	Ensaio 2	82
5.3.5	Ensaio 3	86
5.3.6	Ensaio 4	89
5.3.7	Ensaio 5	92
5.3.8	Discussão dos resultados obtidos - Resposta e problemas observados no teste YES....	94
5.3.9	Discussão dos resultados obtidos – Valores de EC ₅₀ , estrogenicidade e efeito da cloração nas amostras	101
6.	CONCLUSÕES.....	107
7.	SUGESTÕES	109
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

1. INTRODUÇÃO

A preocupação crescente com a preservação dos recursos hídricos destaca a necessidade de um tratamento cada vez mais avançado para a remoção de compostos orgânicos encontrados na água. A presença de hormônios e fármacos em corpos hídricos e descargas de esgoto sanitário aponta estas substâncias como de especial interesse para o tratamento de água, já que a elas se associa a característica de desreguladores endócrinos (REIS FILHO et al, 2006; AWWA, 2007).

Os desreguladores endócrinos são substâncias que provocam interferências no mecanismo regulador de hormônios naturais no corpo humano, causando efeitos adversos à saúde. A detecção de desreguladores endócrinos, como o estradiol, bisfenol A, estrona e etinilestradiol em corpos hídricos vem sendo associada com a observação de que estes têm efeito negativo sobre a comunidade aquática, como a interferência na reprodução de peixes. Também para a saúde humana estas substâncias podem trazer impactos negativos, mas ainda não se tem uma compreensão destes efeitos a longo prazo. Embora estas substâncias possam provocar efeitos negativos nos seres vivos, ainda existem poucos estudos relacionando sua presença no ambiente a estes problemas (USEPA, 2011).

Estas substâncias são identificadas em baixas concentrações, geralmente na ordem de ngL^{-1} ou pgL^{-1} , constituindo-se por isso num desafio às técnicas analíticas disponíveis. Para a sua detecção, normalmente são utilizadas técnicas analíticas avançadas, como cromatografia gasosa ou líquida. Entretanto, estas técnicas são de alta complexidade, tanto em relação à sua execução quanto em relação aos custos envolvidos na aquisição, operação e manutenção de equipamentos.

Para complementar as técnicas analíticas, ensaios *in vivo* e *in vitro* estão sendo utilizados para avaliar a atividade estrogênica em amostras ambientais e de sistemas de tratamento. Entre os testes utilizados, pode-se citar aqueles *in vivo* que avaliam os efeitos de toxicidade em peixes e aqueles *in vitro*, como o teste YES, que avaliam a resposta provocada pelos estrogênios em uma cepa de levedura modificada. Entretanto, a relação dos resultados destes testes com os resultados das técnicas analíticas empregadas ainda não são totalmente esclarecidos, e por isso, os efeitos dos desreguladores endócrinos na saúde ainda não são totalmente conhecidos.

Estes problemas se refletem no conhecimento disponível sobre a presença destas substâncias em ambientes aquáticos ou nos sistemas de tratamento de esgoto e de água. Como não há procedimento padrão para listagem e quantificação destas substâncias, ainda não há controle sobre a emissão destas substâncias no ambiente. Ainda, dispõe-se de pouco conhecimento sobre o efeito das técnicas de tratamento sobre a remoção destas substâncias. Sabe-se que elas podem ser removidas durante o tratamento de água e esgoto, ainda que não completamente, mas este monitoramento ainda é pouco realizado (SNYDER et al, 2003).

Processos oxidativos, como a cloração ou ozonização, empregados normalmente no tratamento de efluentes, vem demonstrando eficiência na remoção dos desreguladores endócrinos mais estudados, como é o caso do estradiol e estrona. (SNYDER et al, 2003; PEREIRA, 2011). O cloro, tradicionalmente utilizado na desinfecção de água e esgotos, como é o caso do Brasil e Estados Unidos, vem se mostrando uma técnica promissora e adequada para a oxidação de desreguladores endócrinos. Entretanto, a formação de subprodutos da oxidação do cloro desperta preocupação, visto que tem sido observado que alguns dos subprodutos da oxidação também podem apresentar atividade estrogênica e agir como desreguladores endócrinos (SNYDER et al, 2003; WESTERHOFF et al, 2005; PEREIRA et al, 2011).

É importante ressaltar que a preocupação com estas substâncias é recente, e ainda não há regulamentação específica para os desreguladores endócrinos, bem como ainda não há completo entendimento dos mecanismos envolvidos na oxidação destas substâncias. Assim, mostra-se necessário a realização de pesquisas nesta área, que envolvam técnicas para identificar e quantificar a estrogenicidade de amostras antes e após processos oxidativos como a cloração.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo geral:

- Estudar o comportamento da estrogenicidade devido ao 17β -estradiol em água de abastecimento antes e após a cloração

Como objetivos específicos, apresentam-se:

- Avaliar a viabilidade do uso do teste YES (Yeast Estrogen Screen) para a detecção e quantificação da estrogenicidade em água de abastecimento

- Avaliar o uso do teste YES na avaliação de atividade estrogênica em amostras submetidas à cloração

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Desreguladores endócrinos e sua presença no meio ambiente

Os processos atuais de intensificação do uso da água e a presença cada vez maior de aglomeramentos urbanos vem intensificando problemas quanto à presença de contaminantes recalcitrantes em ambientes aquáticos. A descarga de efluentes tem sido uma fonte de contaminação de águas superficiais e até subterrâneas, onde tem sido identificado concentrações traço de substâncias que provocam atividade estrogênica, ou seja, agem como desreguladores endócrinos nos seres vivos (PEREIRA, 2011; SNYDER et al, 2003).

Desreguladores endócrinos são substâncias que interferem na síntese, secreção, transporte, recepção, ação ou eliminação dos hormônios naturais do corpo que são responsáveis pela homeostase e regulação dos processos de desenvolvimento naturais (USEPA, 1997). Em suma, são substâncias capazes de estimular ou de bloquear o sistema endócrino dos animais (AWWA, 2007).

Ainda que não haja um consenso sobre uma listagem geral de desreguladores endócrino, estes podem ser classificados em três categorias: estrogênicos, androgênicos e tireoidais. Compostos estrogênicos são aqueles que interferem nos estrogênios naturais, androgênicos afetam ou bloqueiam a testosterona e tireoidais causam efeitos direto ou indiretos na glândula tireóide (SNYDER et al, 2003).

Os dados sobre substâncias consideradas desreguladores endócrinos são ainda bastante escassos. Apesar de muitas substâncias serem consideradas desreguladores endócrinos, como é o caso de alguns fármacos e compostos orgânicos como o bisfenol A e PCBs, não há uma listagem geral que enumere e identifique estas substâncias. Não há inclusive metodologia definida para identificar se uma substância ou mistura de substâncias químicas resultam em efeitos negativos no sistema endócrino (AWWA, 2007).

Apesar de desreguladores endócrinos serem estudados desde 1930, este é um problema emergente para o tratamento de água e de águas residuárias. Apesar de algumas substâncias serem reconhecidas como desreguladores endócrinos, como é o caso de pesticidas como o DDT, o desafio atual encontra-se no estudo de substâncias menos caracterizadas, e de maior polaridade do que os contaminantes conhecidos. Estas substâncias também possuem maior

peso molecular e/ou grupos funcionais polares. Apresentam ainda como dificuldade para sua identificação a baixa concentração em que são detectados, podendo ser da ordem de pgL^{-1} . Assim, é importante destacar que as pesquisas atuais são focadas na caracterização de poluentes que ainda carecem de métodos padrão de identificação (SNYDER et al, 2003). Algumas destas substâncias consideradas desreguladores endócrinos estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Substâncias consideradas desreguladores endócrinos (WESTERHOFF et al, 2005).

Substância	Uso	Massa molar
17 β -estradiol	Hormônio natural	272,2
17 α -etinilestradiol	Hormônio sintético	296,2
Bisfenol A	Utilizado na produção de plástico	228,1
Cafeína	Estimulante	194,2
DDT	Pesticida	354,5
Estriol	Hormônio natural	288,4
Estrona	Hormônio natural	270,4
Fluoxetin	Antidepressivo	309,33
Ibuprofeno	Analgésico	206,1
Progesterona	Hormônio natural	314,2
Triclosano	Antibiótico	289,6

Dentre os desreguladores endócrinos, alguns hormônios, tanto naturais quanto sintéticos, são os que despertam maior preocupação. A origem de substâncias endócrinas em corpos hídricos se deve principalmente às descargas de efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) (TERNES et al, 1999). Por sua vez, a maioria dos estrógenos são excretados no ambiente pela urina humana, por isso, é improvável que a quantidade com que estas substâncias são encontradas em ETEs seja reduzida com o tempo, como é possível com outras substâncias que apresentem atividade estrogênica (GOMES et al, 2005). O tratamento convencional de esgotos não possibilita uma remoção completa dos compostos em questão, e por isso observa-se que estes continuam presentes, ainda que em menores concentrações, no efluente despejado no corpo receptor (TERNES et al, 1999).

Os hormônios femininos e esteróides sintéticos são por sua vez considerados os mais potentes componentes estrogênicos. Atualmente, o uso destes potentes estrógenos em pílulas anticoncepcionais tem levado a grande preocupação com a chegada e impacto destes

compostos nos ambientes aquáticos (ALDA, BARCELÓ, 2001). Os estrógenos naturais 17β -estradiol, estrona e o sintético 17α -etinilestradiol são alguns dos compostos que despertam maior preocupação devido a sua potência e à quantidade com que são continuamente introduzidos no ambiente (REIS FILHO et al, 2006).

O 17β -estradiol (Figura 1) trata-se de um hormônio natural, e sua presença no ambiente passou a ser vista com mais atenção recentemente. O estradiol é excretado no ambiente pela urina de mamíferos, e por isso sempre esteve presente no ambiente. Entretanto, devido ao aumento na densidade populacional e ao aumento na concentração de núcleos urbanos e agrícolas, a concentração desta substância no ambiente pode ter aumentado nas últimas décadas (ALDA e BARCELÓ, 2001).

Figura 1 – Estrutura do 17β -estradiol (ALUM et al, 2004).

A detecção de desreguladores endócrinos no afluente e efluente de Estações de Tratamento de Esgotos e em corpos hídricos foi verificada em diversos países. Ternes et al (1999) estudaram a concentração de alguns estrógenos em Estações de Tratamento de Esgoto no Rio de Janeiro e em Frankfurt, na Alemanha. As Estações apresentavam porte diferente, sendo que ETE do Rio de Janeiro recebia uma vazão de 120096 m³/dia, e a de Frankfurt 41200 m³/dia. Ambas as Estações contavam com tratamento constituído por etapa preliminar, tanque de aeração e clarificação final. Entretanto, cerca de 29% do afluente da Estação do Rio de Janeiro era tratado por um filtro biológico, como alternativa ao lodo ativado. No Rio de Janeiro, observou-se remoção de 99,9% de 17β -estradiol no efluente do lodo ativado. Por sua vez, a remoção observada na Estação alemã foi consideravelmente menor, de 64% para o 17β -estradiol. As diferenças foram atribuídas em parte à diferença de temperatura entre os dois locais durante o período de coleta, que foi em média de 2°C na Alemanha e mais de 20°C no Brasil, e à demais fatores que não couberam no escopo do trabalho.

Solé et al (2000) observaram estrogenicidade na água de dois tributários do rio Llobregat, na região da Catalunha, na Espanha. A estrogenicidade, determinada através de um ensaio “*in vivo*” em carpas, foi atribuída às elevadas concentrações do desregulador endócrino nonilfenol, detectado em concentrações até $343 \mu\text{gL}^{-1}$. Entretanto, a contribuição de estrógenos naturais e sintéticos na estrogenicidade observada, como o estriol, não pode ser descartada. Apesar destes compostos não terem sido detectados nos corpos hídricos, foram detectados em afluentes e efluentes de algumas Estações de Tratamento de Esgoto da região, e por isso podem estar presentes na água dos rios estudados em concentrações inferiores às do limite de detecção do método, mas ainda em concentrações significantes para provocar influência na estrogenicidade do meio.

Também na Austrália foi detectada a presença de estrógenos e xeno-estrogênios em efluentes de Estações de Tratamento de Esgotos. Na região de Queensland do sudeste, foi detectado a presença de estrona ($9,12$ a $32,17 \text{ ngL}^{-1}$), 17β -estradiol ($1,37$ a $5,69 \text{ ngL}^{-1}$) e 17α -etinilestradiol ($0,14$ a $1,20 \text{ ngL}^{-1}$) em cinco ETEs. Foi verificado, por sua vez, que os corpos receptores das cinco ETEs, em diferentes pontos de coleta, apresentavam atividade estrogênica potencial para provocar alterações na comunidade aquática. O efluente das ETEs, juntamente com outras fontes de poluição difusa, foram considerados as fontes dos compostos responsáveis pela atividade estrogênica detectada nos corpos hídricos da região (YING et al, 2009).

É importante apresentar que também no Brasil alguns desreguladores endócrinos foram identificados em algumas regiões, como apresentado por Gerolin (2008), Cordeiro (2009), Kuster et al (2009), Sodr et al (2010) e Jardim et al (2012). A região sudeste do Brasil dispõe de maior quantidade de estudos nesse sentido, e na região de Campinas e grande São Paulo, caracterizada pela intensa ocupação urbana e industrial, e onde se concentra a maiorias destes estudos, alguns hormônios foram identificados em amostras de esgoto e água superficial (SODR et al, 2010; JARDIM et al, 2012).

Na região de Campinas e São Paulo, Sodr et al (2010) identificaram com LC-MS/MS 17β -estradiol, estrona, estriol e bisfenol A em cinco pontos de amostragem na Bacia do rio Atibaia, sendo que a presença destes hormônios foi detectada em concentrações de 39 a $2,2 \text{ ngL}^{-1}$.

Jardim et al (2012) utilizaram o teste BLYES, uma variação dos testes in vitro com uma cepa de levedura bioluminescente, para avaliar a atividade estrogênica em amostras de água superficial e de abastecimento em 5 pontos de coleta no Estado de São Paulo. Não observou-se estrogenicidade para as amostras de água de abastecimento, e nenhuma das substâncias alvo, entre eles o 17β -estradiol, estrona, 17α -etinilestradiol e bisfenol A, foram detectadas nestas amostras. Por sua vez, em águas superficiais observou-se que houve atividade estrogênica em 3 dos pontos de coleta estudados, resultados condizentes com a identificação das substâncias analisadas nestes pontos.

O Brasil, assim como outros países, não dispõe de diretrizes ou regulamentações que estabelecem limites de emissão para substâncias consideradas desreguladores endócrinos. O mesmo acontece em outros países, que apesar de possuírem um maior número de pesquisas na área, ainda não estabeleceram medidas de controle e monitoramento destas substâncias. É o caso dos Estados Unidos, por exemplo, que dispõem de um programa de identificação destas substâncias (Endocrine Disruptor Screening Program), mas que, devido a atrasos nas pesquisas ainda não puderam estabelecer diretrizes definindo quais substâncias devem ser monitoradas, e uma metodologia padrão para que isso ocorra (USEPA, 2011).

Também na Europa a situação é semelhante. Em 1999 a União Europeia lançou um comunicado com uma listagem de substâncias às quais deveria ser dado maior atenção nas pesquisas e políticas públicas. Este comunicado baseava-se ainda em quatro objetivos principais, os quais são: necessidade de pesquisas adicionais sobre os desreguladores endócrinos, necessidade de cooperação internacional no sentido de identificá-los e controlá-los, necessidade de informação à população e de estabelecimento de políticas regulatórias (EUROPEAN COMMISSION, 1999). Entretanto, ainda não foi estabelecida uma legislação regulatória.

3.2 Detecção e remoção de desreguladores endócrinos e atividade estrogênica em água, utilizando a cloração

Pouco é conhecido sobre a remoção de desreguladores endócrinos em Estações de Tratamento de Água. Uma das dificuldades em realizar o controle destas substâncias em

ETAs é a realização das análises químicas para detectar hormônios e fármacos. Estas análises raramente são feitas, pela sua dificuldade, alto custo e porque quando estas substâncias são detectadas, elas se encontram em concentrações muito baixas, próximas ao limite de detecção dos métodos analíticos. Assim, a maior parte dos estudos existentes relacionados à presença de desreguladores endócrinos em água é geralmente realizado em escala de bancada, ou em escala piloto (MARABINI et al, 2006; SNYDER et al, 2003).

Estações de tratamento de água convencionais geralmente utilizam um processo de coagulação/floculação seguido de sedimentação, filtração e desinfecção para obter altas remoções de organismos patogênicos e material orgânico (SNYDER et al, 2003). A remoção de hormônios, fármacos e outras substâncias desreguladoras endócrinas no tratamento de água e águas residuárias pode ser realizada tanto por processos de remoção física, oxidação química avançada e por biodegradação. Entre estes, incluem-se a adsorção por carvão ativado, filtração em membranas, tratamento por lodos ativados, oxidação por cloro, ozônio ou peróxido de hidrogênio, e processos combinados de oxidação, como UV/O₃ ou UV/H₂O₂ (LIU et al, 2009).

A cloração é um dos métodos mais empregados na desinfecção e oxidação de compostos em água, pelo cloro apresentar vantagens econômicas e boa eficiência. A oxidação através da cloração favorece a remoção de compostos com grupamentos fenólicos, dentre os quais se incluem o 17 β -estradiol, estriol, etinilestradiol e estrona (AWWA, 2007; LEE et al, 2004). Deborde e Gunten (2008) destacam que para hormônios estrogênicos a principal reatividade com cloro é esperada no anel fenólico, se a reatividade fraca com outros grupos funcionais é considerada. Para estes compostos, é esperado um ataque eletrofílico do cloro na posição orto e/ou para no radical fenol.

Lee et al (2004) ainda destacam que a maioria das substâncias estrogênicas possuem um anel fenólico em sua estrutura, e este anel fenólico possivelmente sofrerá algum tipo de oxidação quando em contato com uma solução de cloro. Assim, a maioria dos compostos estrogênicos encontrados em água serão oxidados na presença de cloro livre, usualmente aplicado em concentrações entre 1 a 7 mgL⁻¹.

Há entretanto uma grande preocupação com o uso da cloração, devido à formação de trihalometanos e outros subprodutos como o ácido dicloroacético, que podem induzir efeitos carcinogênicos. Há entretanto poucos estudos abordando a formação de subprodutos de

substâncias com potencial estrogênico, bem como a atividade estrogênica destes subprodutos (LEE et al, 2004). Novamente, a maioria dos dados existentes sobre a identificação de subprodutos da cloração e os seus efeitos potenciais na saúde vem de estudos em escala de bancada. E devido à necessidade do uso de técnicas analíticas avançadas, é necessário bastante tempo e investimento para que sejam realizados, sendo que muitas vezes é necessário inclusive a síntese de subprodutos que não são disponíveis comercialmente (WESTERHOFF et al, 2005).

A existência de cloro residual ou não no tratamento é um dos pontos importantes para o controle do processo. Westerhoff et al (2005) observaram até 25% de remoção a mais quando houve residual de cloro. Neste caso, as amostras foram analisadas até 7 dias após a coleta, e comparadas com o resultados de amostras em que o residual de cloro foi eliminado após 24 horas de reação. Isto mostra que algumas substâncias desreguladores endócrinas continuarão a reagir com o cloro residual no sistema de distribuição, pois estarão sujeitas a um tempo de contato superior ao dos pontos de amostragem (usualmente na saída da ETA). Por isso, é importante apontar a necessidade de remoção do residual de cloro quando se analisa amostras ao longo da rede, para que os resultados não sejam alterados por um tempo de reação superior ao do ponto de amostragem.

A influência do tempo de contato e da presença de cloro livre também foi abordada por Lee et al (2004), que observaram a redução da atividade estrogênica utilizando o teste YTA (baseado na quantificação da atividade da β -galactosidase induzida por uma levedura modificada com duas proteínas, uma receptora de hormônio e uma co-ativadora) provocada pela cloração de soluções de bisfenol A, 17 β -estradiol e nonilfenol. A redução da atividade estrogênica mostrou-se altamente dependente do tempo de contato. Após 10 minutos de tempo de contato não observou-se redução significativa da atividade estrogênica do 17 β -estradiol, sendo que sua eliminação completa necessitou de mais de 36 horas de tempo de contato, para uma concentração inicial de cloro de 1,5 mgL⁻¹. A cloração mostrou-se mais uma vez eficiente para a oxidação destas substâncias, mas este estudo mostrou a necessidade de identificar uma condição ótima entre o mínimo tempo de contato com o residual de cloro necessário para a eliminação da atividade estrogênica.

Alum et al (2004) estudaram a cloração de 17 β -estradiol, bisfenol A e de 17 α -etinilestradiol em concentrações iniciais de 100 nM (27,24 μ gL⁻¹), com concentrações de cloro de 0,05 a 0,5 mgL⁻¹ e tempo de contato de 4 dias. O teste E-Screen, com células MCF-7,

foi utilizado na avaliação da estrogenicidade. Observou-se que após quatro dias, quando havia sido completada toda a decomposição do cloro (não havia cloro residual livre), todas as amostras apresentavam atividade estrogênica. Utilizando 1,0 mgCL₂/L no tempo de contato de 24 h, observou-se que durante a primeira hora da cloração de 17β-estradiol obteve-se um nível relativamente baixo de estrogenicidade, que apresentou um constante declínio nas próximas doze horas. O comportamento observado da estrogenicidade sugeriu uma transformação estável do composto de interesse em subprodutos com atividade estrogênica, o que pode ser devido aos subprodutos de transição na cloração.

Chen et al (2007) estudaram a remoção de 17β-estradiol em uma simulação de tratamento convencional de água, em escala de bancada, constituído por pré-cloração, coagulação/filtração, filtração e pós-cloração. Foram estudadas as concentrações iniciais de 100 e 500 ng/L de 17β-estradiol, que obtiveram eficiências totais de remoção no processo de tratamento completo de 88,4 e 89,3%, respectivamente. Tanto na pré-cloração quanto na pós-cloração, as remoções de 17β-estradiol foram entre 20 e 40%.

Westerhoff et al (2005) avaliaram a remoção de fármacos e de estradiol por cloração utilizando concentrações de cloro de 3,8 e 3,5 mg/L e tempo de contato de 24 h, em pH 5,5. A concentração inicial dos compostos de interesse no estudo variou de 10 a 250 ng/L. Nas amostras analisadas, o efluente da cloração apresentou concentração de 17β-estradiol inferior ao limite de detecção do método (1 ngL⁻¹), sendo observado o grande grau de reatividade do cloro com o 17β-estradiol.

Pereira (2011) avaliou a oxidação de 17β-estradiol com cloro. No estudo, a influência da concentração inicial de 17β-estradiol foi observada, sendo que quanto maior a concentração inicial, maior foi a remoção. Para a mesma combinação de concentração de cloro (0,5 mg/L) e tempo de contato (30 min), obtiveram-se as eficiências de remoção de 73, 47 e 39% para as concentrações iniciais de 17β-estradiol de 100 µg/L, 1 µg/L e 100 ng/L, respectivamente. Ainda, foi observado que o coeficiente CT, usualmente utilizado para avaliação do cloro em processos de desinfecção não se mostrou adequado para avaliar o comportamento da cloração de 17β-estradiol, já que nem sempre o aumento do CT resultou num aumento da remoção de 17β-estradiol. No mesmo estudo, Pereira (2011) avaliou os efeitos de biotoxicidade das amostras cloradas em um teste *in vivo* com peixes *Danio rerio*. Observou-se que após a cloração ainda foi observada atividade estrogênica nas amostras, o

que pode demonstrar que os subprodutos da cloração continuaram a apresentar atividade estrogênica.

Hu et al (2003) estudaram a formação de subprodutos da cloração de 17β -estradiol e sua atividade estrogênica. Os ensaios foram realizados com concentração inicial de 50 $\mu\text{g/L}$ de 17β -estradiol, pH 7,5 e temperatura 25°C. Foi estudada a concentração de 1,46 mg/L de hipoclorito de sódio, nos tempos de contato de 10, 30, 60, 120 e 180 min. Os subprodutos identificados apresentaram atividade estrogênica, em diferentes intensidades, e à eles foi atribuída a atividade estrogênica observada na água clorada. A máxima atividade estrogênica foi observada nas soluções cloradas a 10, 30 e 60 min, que foi pouco menor à observada antes da cloração. Para os tempos de contato de 120 e 180 min, a atividade estrogênica foi 40% menor do que a inicial. No caso dos tempos de contato inferiores a 60 min, a presença de monoclora-E1 foi a origem principal da atividade estrogênica. Nos tempos de 120 e 180 min, a atividade foi atribuída à presença de 2,4-dicloro-E2 e 2,4-dicloro-E1.

3.3 Teste YES

Existem diversos testes, *in vivo* e *in vitro*, utilizados para avaliar a atividade estrogênica de compostos ou amostras ambientais. Entre eles, estão os testes *in vivo* com peixes, como o teste ELISA para análise da vitelogenina. Embora interessantes por prover indicações do comportamento a longo prazo e de toxicidade crônica dos componentes testados, os testes *in vivo* em geral tem alto custo e o seu elevado tempo de execução pode se tornar um entrave à sua realização. Assim, o uso de testes *in vitro* com resposta de curto prazo é importante principalmente por fornecer um indicativo rápido de quais substâncias ou amostras podem apresentar atividade estrogênica e devem ser submetidos a um estudo mais detalhado, envolvendo técnicas analíticas e testes *in vivo* (ANDERSEN et al, 1999; BISTAN et al, 2012; ROUTLEDGE E SUMPTER, 1996).

Diversos bioensaios *in vitro* com resposta de curto prazo tem sido desenvolvidos e estudados para quantificação da atividade estrogênica. Entre os mais utilizados, encontram-se o teste E-Screen, baseado na proliferação de células mamárias cancerígenas humanas (MCF-7); o teste YES e algumas de suas variações, baseados na resposta do gene receptor de

estrogênio humano (hER) inserido no genoma de uma cepa de levedura modificada para responder ao estrogênio (ANDERSEN et al, 1999; ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996; SWART et al 2011).

O teste YES (Yeast Estrogen Screen), desenvolvido por Routledge e Sumpter (1996) utiliza uma cepa modificada de *Saccharomyces cerevisiae* para identificar compostos que possam interagir com o receptor de estrogênio humano (hER). A levedura foi modificada para conter este receptor, que teve a sequência de seu DNA integrado ao cromossomo principal da levedura (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996). A levedura contém ainda plasmídeos com o gene de resposta Lac-Z, que quando expressado produz a enzima β -galactosidase. Quando secretada no meio, a β -galactosidase metaboliza o CPRG (clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosida) em lactose e em vermelho de clorofenol, que causa a alteração da cor do meio para vermelho, o que pode ser quantificado a 540 nm. Assim, a expressão da β -galactosidase pode ser quantificada por espectrofotometria, o que permite estimar a concentração de substâncias no meio que possuem comportamento estrogênico (ROUTLEDGE E SUMPTER, 1996; VANDERPERREN et al, 2001).

Entre alguns pontos positivos do teste YES está a sua sensibilidade, que segundo Routledge e Sumpter (1996), chega a detectar concentrações de 17β -estradiol de até 2 ngL^{-1} . A sua simples execução, reprodutibilidade e pouco tempo de ensaio também são características que o tornam favorável ao uso de rotina para identificar atividade estrogênica. Ainda, como provoca uma resposta visível a olho nu, que é a alteração de cor do meio, o teste YES pode ser utilizado tanto para avaliação quantitativa quanto qualitativa das amostras. Como resultado do teste, espera-se a alteração da cor do meio de amarelo para vermelho, com maior intensidade nas amostras mais concentradas, ou seja, com maior concentração de estrogênios, conforme observado na Figura 2 (ROUTLEDGE E SUMPTER, 1996).

Figura 2 – Placa de 96 poços com o resultado do teste YES após o período de incubação. Fonte: Routledge e Sumpter (1996).

A alteração de cor pode ser quantificada pela sua leitura de absorbância, e os valores corrigidos são plotados em função do logaritmo da dose ou fator de diluição, gerando uma curva dose-resposta, como observada na Figura 3, com o formato sigmoidal (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996; VILLENEUVE et al, 2000).

Figura 3 – Curva dose-resposta para o teste YES, apresentando os valores de absorbância do meio plotados contra o log da concentração de 17β-estradiol. Fonte: Routledge e Sumpter (1996).

Difícilmente os dados de um bioensaio *in vitro* geram uma curva dose-resposta linear quando a dose e a resposta são plotadas nas unidades originais (escala decimal). Neste caso um modelo apropriado de regressão deve ser utilizado para determinar a relação dose-

resposta. No teste YES, a transformação aplicada é a log-dose, onde a resposta da absorbância é plotada contra o logaritmo da dose ou fator de diluição correspondente (CHANG, 1975; VILLENEUVE et al, 2000).

A análise dos resultados de bioensaios como o teste YES são baseadas na comparação entre as amostras e a curva padrão. O comportamento das amostras é baseado nas suas diluições e tem-se por objetivo comparar a diluição que representa a resposta real obtida em relação ao padrão. Esta comparação resulta na potência relativa das amostras (FINNEY, 1965). Para o teste YES e a maioria dos bioensaios in vitro a determinação da potência relativa é feita com base nos valores de EC_{50} , que é o valor que elucida 50% da resposta da curva padrão de 17β -estradiol (BILA, 2005).

É importante ressaltar que o teste é bastante sensível, chegando a limites de quantificação de até 2 ngL^{-1} de 17β -estradiol (ROUTLEDGE E SUMPTER, 1996). A pureza dos reagentes utilizados no meio de análise, na curva padrão de 17β -estradiol e na preparação das amostras envolvidas deve ser sempre alta, já que qualquer impureza pode afetar o teste. Mesmo os recipientes de vidro utilizados para armazenar os meios devem ser cuidadosamente limpos, já que qualquer contaminação por compostos estrogênicos nos vidros podem afetar a resposta do teste YES, causando resultados falso positivos (BERESFORD et al, 2000).

O teste YES tem sido utilizado com sucesso na identificação de atividade estrogênica de compostos específicos, de amostras ambientais e no controle de processos de tratamento de água e de efluentes. Em geral, a matriz analisada é submetida a um processo anterior de concentração, geralmente utilizando a extração em fase sólida (SPE), que tem sido empregada com sucesso na detecção de hormônios e fármacos desreguladores endócrinos (BILA, 2005; SNYDER et al, 2003). Entretanto, durante o processo de extração em fase sólida pode ocorrer a perda de compostos voláteis, o que provoca uma redução nos compostos analisados (MARABINI et al, 2006).

Bistan et al (2012) aplicaram o teste YES a amostras afluentes e efluentes de duas Estações de Tratamento de Esgoto na Eslovênia, e dado os resultados positivos na detecção de atividade estrogênica nestas amostras, apontaram o teste YES como uma ferramenta adequada para o controle da atividade estrogênica dos efluentes lançados em rios.

Pawlowski et al (2003) utilizaram o teste YES em amostras de efluente de ETE e do rio Reno, na Alemanha. As amostras, preparadas por extração em fase sólida em coluna C18, foram submetidas ao teste YES como uma forma de comparar os resultados da atividade estrogênica medida pelo teste *in vitro* com as análises químicas realizadas para identificar substâncias com potencial estrogênico. Em todas as amostras foi identificado a presença de substâncias desreguladoras endócrinas e de atividade estrogênica. Os resultados mostraram que o teste YES provou ser uma ferramenta adequada a esta finalidade, mas para compreender melhor o impacto biológico da atividade estrogênica estudos complementares com técnicas *in vivo* são necessários.

Beck et al (2006) utilizaram o teste YES para identificar atividade estrogênica em amostras de água do Mar Báltico, na Alemanha. Algumas espécies de peixes vem apresentando problemas reprodutivos nesta região, o que motivou os pesquisadores a realizarem uma primeira triagem da atividade estrogênica em cinco pontos de monitoramento. Todas as amostras submetidas ao teste YES indicaram a presença de atividade estrogênica, e os resultados foram confirmados pela análise das amostras em LC-MS/MS, que quantificou substâncias estrogênicas como o 17 α -etinilestradiol, bisfenol A e 4-tércio-octilfenol nos pontos de coleta. Os autores ressaltam que o teste YES mostrou-se uma ferramenta adequada à uma primeira identificação de atividade estrogênica nos extratos das amostras de água. Entretanto, como o teste *in vitro* se baseia na resposta da *Saccharomyces cerevisiae* aos compostos estrogênicos, é necessário a realização de estudos futuros complementares, envolvendo testes *in vivo* e mais técnicas analíticas, para poder correlacionar os resultados obtidos aos problemas encontrados na região. Como o teste YES não contém mecanismos endócrinos complexos relacionados com sua resposta, associar seus resultados aos problemas observados em populações de peixes seria precipitado.

3.4 Problemas associados ao teste YES

O teste YES se trata de um bioensaio indireto, que permite uma indicação do efeito biológico da amostra. Este tipo de bioensaio permite que se obtenha a resposta a diferentes compostos em conjunto. Este é mais um caráter positivo deste tipo de teste, já que em amostras ambientais podem existir compostos que não seriam detectados por técnicas

analíticas (VILLENEUVE et al, 2000). Entretanto, existem alguns problemas associados aos resultados do teste YES, tanto relacionados à análise dos dados de bioensaios indiretos quanto à existência de interferentes na resposta do teste, que tem sido discutidos na literatura, e que serão abordados neste trabalho.

Alguns compostos podem interferir no resultado do teste, seja por meio da presença de compostos tóxicos na amostra, o que provoca a inibição do crescimento da levedura ou pela presença de compostos que interfiram na leitura de cor (BILA, 2005; BISTAN et al, 2011). Ainda, durante o teste, podem ser formados subprodutos, consequência da degradação do CPRG, por exemplo, que adicionam estrogenicidade à amostra, interferindo nos resultados do teste. (VANDERPERREN et al, 2001).

Muito tem sido discutido sobre a interferência do CPRG nos resultados do teste YES. Vanderperren et al (2001) observaram altos valores de absorbância nos resultados das amostras de branco após um longo período de incubação (de até 6 a 7 dias). O mesmo ocorria com um menor período de incubação (até 2 dias) quando o número inicial de células de leveduras no teste era superior àquele recomendado por Routledge e Sumpter (1996). Assim, os autores formularam a hipótese de que o CPRG ou o seu produto vermelho de clorofenol poderiam interferir na estrogenicidade do ensaio. Em concentrações baixas, até $1,65.10^{-4}$ M, não se observou interferência do CPRG. Entretanto, a partir desta concentração, que é a utilizada por Routledge e Sumpter (1996), observou-se a resposta positiva à estrogenicidade no teste. Nos modelos propostos por Vanderperren et al (2001), a interferência no teste foi atribuída principalmente ao CPRG, e não ao vermelho de clorofenol. Entretanto, isto ocorre somente se o CPRG e os compostos estrogênicos presentes na amostra agem sinergicamente.

Algumas adaptações do teste YES tem sido estudadas, de modo a evitar a possível interferência que o CPRG pode causar no seu resultado. Bistan et al (2012) propuseram uma otimização do teste com menor concentração de CPRG no meio ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e menor tempo de incubação (48 a 58 h). Os autores ainda utilizaram o comprimento de onda de 575 nm para a quantificação da indução da β -galactosidase, por este prover uma resposta superior à encontrada para o comprimento de onda de 540 nm utilizado no teste original. Os autores obtiveram bons resultados quanto à especificidade do teste a compostos como o bisfenol A, obtendo resultados próximos ao de Routledge e Sumpter (1996) e resultando em bons resultados no uso do teste na determinação de estrogenicidade em afluente e efluente de estações de tratamento de esgoto.

Também De Boever et al (2001) propuseram uma alteração no teste YES, adicionando o CPRG em uma solução com cicloheximida às placas com o meio de análise e as amostras somente após 24 h de incubação. Durante as primeiras 24 h a levedura tem o contato com a amostra e sintetiza a β -galactosidase. A adição da cicloheximida interrompe a síntese de proteínas da levedura, e a síntese da β -galactosidase.

Beresford et al (2000) estudaram a influência de algumas variáveis que vem sendo modificadas do teste padrão e problemas relacionados a estas na resposta do teste YES. Alguns dos principais fatores estudados foram o tempo de incubação, o uso de solventes diferentes do etanol absoluto e o número inicial de células de levedura. O tempo de incubação causou interferência nos resultados tanto da curva padrão de 17 β -estradiol quanto nas amostras de branco. O teste tornou-se mais sensível com o tempo de incubação maior, de 8 dias, sendo que o EC₅₀ do 17 β -estradiol reduziu de $2 \cdot 10^{-10}$ para $7 \cdot 10^{-11}$ M. No oitavo dia a absorbância das amostras de branco estava superior à do terceiro dia, devido à expressão da β -galactosidase.

Beresford et al (2000) também observaram que o aumento no número inicial de células no ensaio aumentou sua sensibilidade, indicado pelo deslocamento da curva padrão para a esquerda (reduzindo o valor de EC₅₀), em relação ao teste padrão proposto por Routledge e Sumpter (1996).

A interferência de substâncias tóxicas no crescimento da levedura no teste YES é um outro problema discutido na literatura. A inibição do crescimento da levedura foi observada por Beresford et al (2000), que quando realizaram o teste para o 4-tert-octilfenol, não obtiveram resposta para as quatro amostras mais concentradas estudadas. A partir de amostras menos concentradas, observou-se que houve a indução da β -galactosidase, em função da dose. Assim, nas maiores concentrações, o 4-tercio-octilfenol mostrou-se tóxico à levedura.

Esta mesma substância, o 4-tercio-octilfenol, quando submetida em altas concentrações ao teste YES, levou Beresford et al (2000) à indicação da ocorrência de contaminação cruzada entre as linhas da placa de 96 poços. As linhas de branco ficaram contaminadas após o período de incubação, o que mostrou que, em altas concentrações, algumas substâncias podem circular livremente pela placa de análise, o que pode levar a falsos positivos no resultado do teste. Neste caso, vale destacar que uma alternativa para monitorar e evitar o problema de contaminação cruzada é a prática de alternar as linhas de

amostras com os brancos, como realizado por Bila (2005) ou deixar uma linha vazia entre cada amostra, como apresentado por Hamblen et al (2003).

Beck et al (2006) observaram efeitos de toxicidade no teste YES na análise de amostras de água de cinco estações de coleta no Mar Báltico na Alemanha. Nas amostras mais concentradas observou-se a inibição do crescimento da levedura, o que levou à uma redução da resposta do teste YES à atividade estrogênica. A inibição do crescimento foi atribuída à provável presença de substâncias tóxicas nas amostras. Nestas amostras, observou-se uma relação inversa entre o crescimento da levedura e a atividade estrogênica, conforme apresentado na Figura 4. A inibição do crescimento da levedura foi controlado pela medida da absorbância a 640 nm, comparada em relação ao crescimento da levedura no controle (solvente).

Figura 4 – Relação entre atividade estrogênica e inibição do crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*, conforme apresentado por Beck et al (2006).

Frische et al (2009) também abordaram problemas decorrentes da toxicidade nas amostras à levedura. Os autores observaram que a presença de substâncias tóxicas em concentrações causando uma inibição significativa no crescimento da levedura provocaram uma alteração no resultado do teste, resultando em uma redução ou completa inibição dos resultados da atividade estrogênica observada. Assim, tal fato pode levar à classificação incorreta da atividade estrogênica de alguns compostos. Por esta razão, controlar a presença

de compostos tóxicos e sua influência na inibição do crescimento da levedura é uma ferramenta importante para detectar resultados falso-negativos no teste YES.

Frische et al (2009) destacam que em amostras ambientais, este problema pode ser ainda mais acentuado, devido à presença de compostos que agem como (xeno)estrógenos e que podem se tornar tóxicos à levedura quando presentes em altas concentrações. Em casos onde a resposta do teste YES foi muito superior ao esperado, pode ser consequência da falta de conhecimento dos (xeno)estrógenos presentes na amostra. Já quando o resultado é bastante inferior ao esperado, isto é uma forte evidência de que ocorreu alteração nos resultados devido à toxicidade presente nas amostras.

Um outro problema controverso na análise dos resultados do teste YES recai na condição de paralelismo que deve existir entre as curvas das amostras e do padrão analisado (FINNEY, 1965; VILLENEUVE et al, 2000). Como regra geral para bioensaios, para que os resultados possam ser comparados e a potência relativa calculada, as curvas devem apresentar a mesma declividade. Beresford et al (2000) destacam que calcularam as potências relativas somente quando as curvas das amostras resultaram paralelas ao padrão de 17β -estradiol. Outros autores, como Villeneuve et al (2000) propõem o uso de um método baseado na estimativa da potência relativa para uma faixa de resposta, que seja entre 20 e 80% da resposta máxima obtida para o padrão.

Destaca-se que, ainda que a condição de paralelismo entre as curvas não seja completamente atendida, os resultados de um ensaio comparativo como o YES fornecem indicações preliminares relevantes para a identificação e quantificação de atividade estrogênica (FINNEY, 1965).

Outra condição que deve existir para que a potência relativa possa ser estimada com segurança é que as amostras devem apresentar a mesma faixa de resposta do que o padrão, ou seja, a máxima indução da β -galactosidase deve ser atingida nas amostras e no padrão, e o gradiente da resposta deve ser semelhante (FINNEY, 1965; VILLENEUVE et al, 2000). Curvas que resultam em faixas de absorbância abaixo do padrão foram referidas por Beresford et al (2000) como curvas dose-resposta submáximas.

Andersen et al (1999) propuseram uma classificação da estrogenicidade das amostras em relação à sua resposta. A amostra foi classificada como completamente estrogênica se a

resposta foi superior a 75%, parcialmente estrogênica se a resposta era entre 10 a 25% e negativa se inferior a 10% da resposta induzida pelo 17 β -estradiol.

Vale ainda ressaltar que somente o uso do teste YES não é suficiente para relacionar a atividade estrogênica a problemas ambientais observados, ou à quantificação de compostos estrogênicos. Beck et al (2006) ressaltam que o teste YES mostrou-se uma ferramenta adequada à uma primeira identificação de atividade estrogênica nos extratos das amostras de água do Mar Báltico, na Alemanha. Entretanto, como o teste *in vitro* se baseia na resposta da *Saccharomyces cerevisiae* aos compostos estrogênicos, é necessário a realização de estudos futuros complementares, envolvendo testes *in vivo* e mais técnicas analíticas, para poder correlacionar os resultados obtidos aos problemas com reprodução de peixes encontrados na região. Como o teste YES não contém mecanismos endócrinos complexos relacionados com sua resposta, associar seus resultados aos problemas observados em populações de peixes seria precipitado.

Frische et al (2009) também ressaltam que o uso do teste YES em amostras ambientais deve ser analisado com cautela, já que a presença de misturas complexas de compostos estrógenos nestas amostras pode causar interferências no ensaio, consequência de efeitos tóxicos, e subestimar a atividade estrogênica das amostras.

Folmar et al (2002) compararam os resultados de dois ensaios *in vitro* com os resultados de um ensaio *in vivo*, e observaram que não foi possível extrapolar os resultados dos testes *in vivo*, prevendo que as amostras manteriam a mesma ordem de potência relativa nos dois tipos de ensaios. Foram estudados a potência relativa do 17 β -estradiol e etinilestradiol. Em geral, os resultados dos ensaios *in vitro* estudados (E-Screen e uma metodologia modificada do ensaio YES) demonstraram uma potência relativa inferior à observada no teste *in vivo* com uma espécie de bagre.

Brix et al (2010), por sua vez, observaram bons resultados de correlação entre os resultados obtidos com o teste YES e mais dois bioensaios com os valores esperados por análises químicas (cromatografia LC-MS e LC-MS/MS). Neste sentido, Brix et al (2010) propõem que o teste YES e demais bioensaios sejam utilizados como uma forma de selecionar as amostras estudadas que apresentem resposta biológica. Estas amostras podem então ser submetidas a análises químicas posteriores para uma caracterização mais completa dos compostos presentes nelas. Os autores ressaltam que isto poderia levar a uma redução nos

custos com análises laboratoriais, já que, em geral, o custo de um bioensaio é cerca de 8% do custo das análises químicas para cada amostra.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Tratamento Avançado e Reuso de Água - Latar, da Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo. A primeira etapa do trabalho consistiu na implementação do teste YES no Latar. Para tanto, foi realizado treinamento no Laboratório de Engenharia Sanitária (LES) do Departamento de Saneamento e Meio Ambiente da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (DESMA/UERJ), sob a supervisão da Profa. Dra. Daniele Maia Bila.

Entretanto, durante a implementação foram encontrados alguns problemas nos resultados obtidos com os testes, o que impediu que este fosse executado com resultados confiáveis. Por esta razão, a segunda etapa do trabalho envolvendo os exames com o teste YES foi desenvolvida no LES (DESMA/UERJ). Assim, os ensaios de oxidação com cloro foram concluídos no Latar e as amostras para o teste YES foram processadas no laboratório da UERJ.

4.1. Análises Físico-Químicas

Neste trabalho a água proveniente do poço artesiano localizado na Área 1 do campus da USP – São Carlos foi adotada como água de estudo. Para os ensaios de oxidação do 17 β -estradiol esta matriz foi fortificada com o hormônio.

Adotou-se esta matriz para os ensaios por esta se assemelhar à água obtida em estações de tratamento de água após a etapa da filtração. Ainda, pesquisas desenvolvidas no Latar vem utilizando esta matriz, como é o caso de Pereira (2011).

A caracterização da água de estudo foi feita por meio das seguintes variáveis: pH, temperatura, alcalinidade, turbidez, cor e condutividade, segundo os métodos apresentados em APHA, AWWA e WEF (2005). Um resumo dos métodos e equipamentos utilizados está apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Métodos utilizados para a caracterização físico-química da água de estudo.

Variável	Método	Equipamento	Referência
pH	4500-H+B	Qualxtron 8010	APHA, AWWA e WEF (2005).
Alcalinidade	2320B	Qualxtron 8010	
Cor	2120	HACH DR2800	
Condutividade	2510	Digimed DM-31	
Turbidez	2130B	HACH 2100N	

4.2. Análise de cloro por titulometria

As análises de concentração de cloro e de cloro residual foram feitas pelo método DPD titulométrico (APHA, AWWA e WEF, 2005). O método é adequado quando não se pretende diferenciar as concentrações entre as espécies de cloro, e pode ser utilizado para determinar concentrações de cloro até 5 mgL^{-1} .

Neste método, realiza-se a titulação da amostra utilizando solução de sulfato ferroso amoniacal, após a adição de solução tampão de fosfato e uma solução indicadora de DPD. Todas as soluções envolvidas na titulação foram preparadas segundo as orientações de APHA, AWWA e WEF (2005). A solução indicadora de DPD foi preparada sempre próximo das análises. Como esta solução é facilmente degradável, controlou-se a leitura de sua absorbância a 515 nm periodicamente, para garantir que estivesse na faixa aceitável de uso (até 0,002).

4.3. Ensaio de oxidação com cloro

Os ensaios foram realizados em batelada, em equipamento de Jar-test. A água de estudo utilizada foi proveniente do poço artesiano localizado na Área 1 do campus da USP – São Carlos.

A sequência em que os ensaios foram realizados foi adaptada de Pereira (2011):

- Distribuição de 1,5L da água de estudo em cada béquer, ajuste do gradiente de velocidade do Jar-test (60 s^{-1}) e medição de temperatura;
- Transferência da quantidade de hormônio desejada para cada béquer;
- Dosagem de cloro na concentração desejada;
- Coleta de amostra da água para análises após o tempo de contato desejado. As análises de cloro residual foram realizadas no momento da coleta. Para as demais análises, foi adicionado metabissulfito de sódio nas amostras de água para eliminar o cloro residual.

A dosagem do hormônio 17 β -estradiol foi realizada a partir de uma solução estoque na concentração de 1000 mgL^{-1} (padrão 99,9%, Sigma-Aldrich[®]), preparada em etanol (grau HPLC, Sigma-Aldrich[®]). Optou-se por preparar esta solução em etanol para minimizar possíveis efeitos tóxicos que o solvente pudesse oferecer às amostras, o que poderia interferir na realização do teste YES.

O oxidante utilizado foi o hipoclorito de sódio (P.A., 10-15%, Sigma-Aldrich[®]). Para tal, foi preparada uma solução estoque de cloro, com concentração de 1000 mg.L^{-1} . Esta solução estoque foi feita em água ultrapura previamente fervida, segundo as recomendações de APHA, AWWA, WEF (2005) e armazenada a 4°C em frasco âmbar. Optou-se por utilizar água ultrapura para a solução estoque para minimizar a interferência que o uso de água destilada poderia causar nos ensaios de estrogenicidade. É importante destacar que a determinação da concentração estoque de cloro foi sempre realizada no momento da realização dos ensaios, visto que a concentração da solução de hipoclorito de sódio pode ser alterada conforme a temperatura e condições de armazenamento.

Para eliminar o cloro residual após o tempo de contato dos ensaios utilizou-se uma solução de metabissulfito de sódio, preparada a 3% (m/V) em água ultrapura. Adicionou-se 0,1 mL desta solução para cada 100 mL de amostra, seguindo o procedimento adotado previamente por Souza (2006).

Toda a vidraria utilizada nos ensaios e análises foi rigorosamente limpa antes da realização dos ensaios. A vidraria foi deixada de molho em solução de extran 5%, por pelo menos 12 horas, sendo então enxaguada com água corrente, água destilada e água ultrapura. Toda a vidraria utilizada foi dedicada aos ensaios, para minimizar o risco de contaminação devido ao seu uso com diferentes amostras. Tomou-se ainda o cuidado de armazenar todas as amostras em frascos de vidro previamente limpos, evitando seu contato com frascos de plástico ou outro material, como alumínio, que pudesse influenciar na estrogenicidade das amostras.

Da mesma maneira, antes da realização de cada ensaio limpou-se as hastes do equipamento de Jar-teste com solução de extran 5%. As hastes ficaram mergulhadas na solução de extran por pelo menos 12 horas, sendo após enxaguadas com o água corrente, água destilada e água ultrapura. O equipamento de Jar-teste foi utilizado exclusivamente para os ensaios durante este período, para evitar possível interferência devido ao seu uso com outros tipos de amostras.

Os ensaios de Jar-test foram todos realizados no Latar, bem como a fase inicial do processamento das amostras. As amostras foram extraídas até a fase de passagem da amostra. Após esta etapa os cartuchos de SPE foram armazenados sob refrigeração até sua análise no LES. O transporte dos cartuchos entre as cidades de São Carlos – SP e Rio de Janeiro – RJ também foi realizado sob refrigeração.

Devido a limitações no processamento das amostras, bem como na logística de transporte dos materiais necessários para as análises no LES (DESMA/UERJ), o número de ensaios submetidos ao teste YES foi limitado a cinco.

As variáveis que influenciam nos ensaios de oxidação com cloro consistem em: concentração de 17β -estradiol, concentração aplicada de cloro e tempo de contato. Como o número de ensaios foi limitado, optou-se por fixar o tempo de contato e variar os demais parâmetros. Assim, foi estabelecido o tempo de 30 minutos, que corresponde ao tempo

mínimo recomendado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011) para a etapa de cloração em Estações de Tratamento de Água. Um resumo dos ensaios realizados está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 – Ensaios de oxidação com cloro

Ensaio	Concentração de 17β-estradiol (ngL⁻¹)	Concentração de cloro aplicada (mgL⁻¹)	Tempo de contato (min)
1	1000 ngL ⁻¹	1	30
2	100 μ gL ⁻¹	1	
3	500 ngL ⁻¹	1	
4	500 ngL ⁻¹	2	
5	1000 ngL ⁻¹	2	

Em todos os ensaios resultou-se nas seguintes amostras: água do poço (branco), água do poço oxidada, água do poço com 17 β -estradiol, água do poço com 17 β -estradiol oxidada. As amostras do branco foram preparadas uma única vez, e as de água do poço com 17 β -estradiol antes e após a oxidação com cloro foram analisadas em duplicata.

A caracterização físico-química foi realizada para as amostras de água do poço antes e após a cloração. Todas as amostras foram submetidas ao teste YES.

4.4. Metodologia de extração

A extração das amostras de água para a realização do teste YES após os ensaios foi realizada pelo método de extração em fase sólida (SPE) em coluna C18. A coluna utilizada foi a BondElut C18 (500 mg, 3 mL) da Agilent[®], seguindo a metodologia adotada por Bila (2005). O processo de extração foi realizado em Manifold para 10 cartuchos, da Agilent Technologies[®].

Toda a vidraria utilizada foi limpa com solução a 5% de extran, enxaguada com água de torneira, água destilada e água Milli-Q. Após a secagem, a vidraria foi rinsada com acetona (grau HPLC, JT Baker).

A metodologia de extração seguiu o roteiro:

1. Condicionamento do adsorvente C18:

3x2 mL de hexano; 1x2 mL de acetona; 3x2 mL de metanol; 5x2 mL de água Milli-Q com pH 3 (ajustado com ácido clorídrico);

2. Amostra:

Passagem de 1 L da amostra com pH 3 (ajustado com ácido clorídrico), com fluxo de 20 mL/min;

3. Eluição:

4x1 mL de acetona.

Após a extração, o volume eluido foi seco em um fluxo de nitrogênio e o analito ressuspendido em 2 mL de etanol (grau HPLC, Sigma-Aldrich®). Aqui, a secagem com nitrogênio foi realizada somente nas amostras analisadas no Latar. No LES as amostras foram secas dentro da capela com o exaustor ligado. Neste método de extração, as amostras são concentradas 500 vezes em relação à amostra inicial.

4.5. Teste YES (Yeast Estrogen Screen)

A primeira etapa do trabalho consistiu na implementação do teste YES no LATAR. Para a implementação do teste, foi realizado treinamento no Laboratório de Engenharia Sanitária (LES) do Departamento de Saneamento e Meio Ambiente da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (DESMA/UERJ), sob a supervisão da Profa. Dra. Daniele Maia Bila.

Entretanto, durante a implementação foram encontrados alguns problemas nos resultados do teste, o que impediu que este fosse executado com sucesso no Latar. Por esta razão, a segunda etapa do trabalho envolvendo os exames com o teste YES foi desenvolvida no LES (DESMA/UERJ), sob a supervisão da Profa. Dr. Daniele Maia Bila. As diferenças entre os equipamentos ou reagentes dos dois laboratórios estão apresentadas na descrição dos procedimentos.

4.5.1. Preparo das soluções

O preparo das soluções utilizadas no teste YES foi realizado segundo o protocolo apresentado por Routledge and Sumpter (1996), seguindo as orientações e adaptações de Bila (2005), adotadas no LES (DESMA/UERJ).

Todo o material envolvido no preparo das soluções foi previamente limpo com extran, água destilada, água ultrapura e enxaguados com etanol (grau HPLC, Sigma-Aldrich®), segundo as orientações de Bila (2005). A vidraria utilizada foi dedicada exclusivamente ao teste YES, para evitar possíveis interferências ou contaminações.

Impurezas ou contaminações podem causar falsos positivos no teste YES, por isso todos os reagentes, água e materiais utilizados na manipulação das soluções do teste devem ter alto grau de pureza. Todos os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich®, com alto grau de pureza, e utilizados exclusivamente para o teste. Os demais cuidados foram tomados seguindo as orientações de Bila (2005).

Para o preparo das soluções, os reagentes foram pesados em copos descartáveis limpos, destinados a este uso. Para realizar a transferência dos reagentes não utilizou-se água nos copinhos, para evitar que alguma contaminação do plástico pudesse ser transferida para a solução. A haste utilizada para a pesagem dos reagentes foi limpa a cada reagente utilizado, com etanol absoluto. Após a esterilização, todas as soluções preparadas foram abertas somente na capela de fluxo laminar.

As soluções foram preparadas segundo os procedimentos descritos a seguir.

4.5.1.1. 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 ; 1 mL de solução de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (40 mg/50 mL de água Milli-Q); 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 e 375 mg de L-serina.

Este meio foi dividido em 2 alíquotas, armazenado em frascos de vidro e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. A solução foi então estocada à temperatura ambiente, com o cuidado de vedar a rosca do frasco de vidro com filme plástico.

4.5.1.2. Solução de vitamina

A solução 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 e 20 mL de solução de biotina (2 mg/100 mL de água Milli-Q).

A solução foi esterilizada utilizando-se um kit de filtração estéril, com membrana de 0,2 μm , e armazenada a 4°C em alíquotas de 10 mL em tubos falcon estéreis, com o cuidado de vedar a rosca com filme plástico. Todo o procedimento de filtração foi realizado em capela de fluxo laminar.

4.5.1.3. Solução de glucose

A solução de glucose foi preparada a 20% p/v (20 g/100 mL), dissolvendo a glucose em água ultrapura, e esterilizada em frascos de vidro em autoclave a 121°C por 10 min. A

solução foi armazenada à temperatura ambiente, novamente com o cuidado de vedar a rosca do frasco de vidro com filme plástico.

4.5.1.4. Solução de ácido L-aspártico

A solução de ácido L-aspártico foi preparada na concentração de 4 mg/mL, com água ultrapura, e esterilizada em autoclave a 121°C por 10 min. A solução foi armazenada à temperatura ambiente, com o cuidado de vedar a rosca com filme plástico.

4.5.1.5. Solução de L-treonina

A solução estoque foi preparada na concentração de 24 mg/mL (600 mg/25 mL) com água ultrapura e esterilizada em autoclave a 121°C por 10 min. Os frascos com a solução foram armazenados a 4°C, com o cuidado de vedar a rosca com filme plástico.

4.5.1.6. 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. A solução foi esterilizada utilizando-se um kit de filtração estéril com membrana de 0,2 µm, e armazenada em tubos falcon, à temperatura ambiente, novamente, com o cuidado de vedar a rosca dos tubos com filme plástico antes do armazenamento.

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

A solução de CPRG foi preparada sempre no dia em que os testes seriam feitos. A solução foi feita na concentração de 10 mg/mL, utilizando água Milli-Q. Foi armazenada em frascos de vidro âmbar estéreis, à temperatura de 4°C. Os frascos foram cobertos com papel alumínio, para evitar a passagem de luz para a solução.

4.5.1.8. Meio de cultivo

O meio foi preparado pela mistura de: 5 mL da solução de glucose; 1,25 mL da solução de ácido L-aspártico; 0,5 mL da solução de vitamina; 0,4 mL da solução de L-treonina; 125 μ L da solução de sulfato de cobre (II) e 45 mL de meio mínimo.

O procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar, e a solução foi armazenada em frasco de vidro estéril, à temperatura ambiente. O meio de cultivo foi utilizado dentro do prazo máximo de 2 semanas. Preferencialmente, o meio de cultivo foi preparado sempre no momento do seu uso.

4.5.2. Cultivo da cepa

A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada foi gentilmente cedida pela Profa. Marcia Dezotte (UFRJ) e Profa. Daniele Maia Bila (UERJ).

O preparo da cepa foi realizado segundo o protocolo apresentado por Routledge e Sumpter (1996). O procedimento foi aprendido em visita ao Laboratório de Engenharia Sanitária (DESMA/UERJ), sob a supervisão da Profa. Daniele Bila.

O flaconete contendo a cultura de levedura preservada com glicerol foi armazenado em freezer a -80°C até o momento da utilização.

Próximo da realização dos ensaios, a cepa foi descongelada à temperatura ambiente e centrifugada a 4°C por 10 minutos a 2000 g. O sobrenadante foi descartado, e metade das células foi ressuspensa em 5,0 mL do meio mínimo com 15% de glicerol. Esta cultura foi dividida em dois frascos de cultivo, ao qual foram adicionados 10 mL do meio de cultivo. Os frascos de cultivo foram incubados sob agitação, a 28°C e 100 rpm. A parcela restante das células foi armazenada em glicerol, e novamente congelada, para a manutenção da cepa.

O procedimento de repique foi realizado novamente após 24 horas, adicionando-se 100µL da cultura inicial a um frasco de cultivo contendo 10 mL de meio de cultivo. Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar. Os frascos de cultivo foram incubados a 28°C e 100 rpm. Próximo à realização do teste, de 1 a 3 dias antes, o repique foi realizado novamente, para que a cepa pudesse ser utilizada.

4.5.3. Procedimento do teste YES

As amostras foram analisadas em duplicata, juntamente com a curva de 17β-estradiol. O procedimento para o teste seguiu as orientações de Routledge e Sumpter (1996) e de Bila (2005). O procedimento foi realizado conforme treinamento realizado no Laboratório de Engenharia Sanitária (LES/DESMA/UERJ).

O teste foi realizado em placas de 96 poços para cultura, com fundo chato e tampa, estéreis (TPP®). Todo o material utilizado para manuseio e armazenamento de soluções durante a execução do teste foi previamente esterilizado. As ponteiros utilizadas foram limpas com água ultrapura e etanol antes de autoclavadas. As ponteiros foram utilizadas somente uma vez e descartadas.

4.5.3.1. Diluições das amostras

O preparo das diluições foi realizado em uma placa de 96 poços dedicada a esta finalidade. As amostras foram diluídas na proporção 1:2, seguindo o roteiro:

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

As amostras diluídas foram transferidas imediatamente para a placa de análise, no volume de 10 µL de cada amostra, em duplicata. Deixou-se as amostras evaporarem, conforme o procedimento de Routledge e Sumpter (1996), dentro da capela de fluxo laminar, para dar prosseguimento ao teste. Durante a preparação das placas, tomou-se o cuidado de não encostar a ponteira na borda dos poços, para evitar contaminação dos poços vizinhos.

4.5.3.2. Diluições da curva padrão de 17β-estradiol

O teste YES é sempre executado com uma curva padrão de 17β-estradiol como referência. Esta curva abrangeu as concentrações de 17β-estradiol de $2 \cdot 10^{-7}$ M a $9,77 \cdot 10^{-11}$ M ($54,48 \mu\text{gL}^{-1}$ a $0,27 \text{ ngL}^{-1}$). Para as análises realizadas no LES (DESMA/UERJ) utilizou-se a solução estoque do laboratório, utilizada em suas análises. Esta solução foi preparada a partir do padrão de 17β-estradiol (> 98%, Sigma-Aldrich®) em etanol (grau HPLC, Merck).

No Latar utilizou-se solução de estradiol preparada partir de uma solução estoque a $29,4 \cdot 10^{-5}$ M ($54,48 \text{ mg.L}^{-1}$). A partir desta solução, realizou-se uma diluição 1:1000 para se obter a solução de concentração $29,4 \cdot 10^{-8}$ M utilizada nos testes. Para o preparo destas soluções, utilizou-se o padrão de 17β -estradiol (Sigma Reference Standard, Sigma-Aldrich[®]) diluído em etanol (grau HPLC, Sigma-Aldrich[®]) e adotou-se o volume de 100 mL. As soluções foram armazenadas a 4°C em frasco de vidro âmbar.

A diluição da curva foi realizada serialmente, na placa dedicada à diluição. O procedimento seguiu o mesmo adotado para as amostras, realizando-se diluições 1:2, conforme apresentado:

- Adicionar 100 μL de etanol (grau HPLC) nos poços da fileira de diluição do padrão, com exceção do primeiro poço.
- No primeiro poço, adicionar 200 μL da solução estoque de 17β -estradiol
- No segundo poço, adicionar 100 μL da solução do primeiro poço e agitar (a agitação foi feita com a própria pipeta automática, retirando e retornando a amostra do poço diversas vezes).
- No terceiro poço, adicionar 100 μL da solução do terceiro poço e agitar;
- Seguir com este procedimento até o último poço, que ficará com o volume final de 200 μL .

A solução padrão diluída foi transferida imediatamente para a placa de análise, no volume de 10 μL de cada concentração, em duplicata. Deixou-se as amostras evaporarem, dentro da capela de fluxo laminar, para dar prosseguimento ao teste. Na transferência, tomou-se o cuidado de não encostar a ponteira na borda dos poços, para impedir contaminação dos poços vizinhos.

4.5.3.3. Preparo do meio de análise para o teste YES

O preparo do meio de análise para o ensaio foi realizado em tubos do tipo falcon, estéreis. Foi inicialmente preparado o meio com a levedura e em seguida o meio de análise.

Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar. O preparo seguiu o roteiro apresentado:

1. Preparo do meio com a cultura de levedura

Em um tubo falcon estéril foram adicionados 4,0 mL do meio de cultivo e 1,1 mL do cultivo da levedura (preparado de 1 a 3 dias antes do teste, conforme apresentado em 4.5.2. Cultivo da cepa). 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 (de 0,2 a 0,2 mL) até atingir a absorbância de 0,8
- Absorbância superior a 1,0: adicionar pequenos volumes de meio de cultura.

Vale destacar que este procedimento foi todo 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. Portanto, o preparo desta etapa do teste YES foi sempre realizado em duplicata ou ainda em triplicata, já que pelo menos um dos tubos era descartado.

Este procedimento é uma adaptação do método original de Routledge e Sumpter (1996) para facilitar a etapa de contagem das células de levedura, e tem sido adotado com sucesso em diversas pesquisas, como Bistan et al (2012) e De Boever et al (2001).

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. Foi preparado um tubo falcon com o meio de análise por placa de 96 poços utilizada em cada batelada de testes.

4.5.4. Preparo das placas de teste

O preparo das placas de análise foi realizado conforme exemplificado na Figura 5. 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 o branco (somente etanol).

Figura 5 – Placa com as amostras após o período de incubação

Em toda batelada de testes realizados foi feita uma a curva de 17β -estradiol, pelo menos em duplicata. Assim, uma das placas continha sempre a curva nas linhas A e C e uma amostra nas linhas E e G.

Para o preparo da placa de análise, inicialmente adicionou-se 10 μ L de etanol em cada placa nas linhas correspondentes aos brancos. Em seguida, foram transferidos 10 μ L de cada amostra para a linha correspondente da placa. Após a evaporação completa das amostras, foi adicionado 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 ponteiros a cada amostra.

As placas foram então fechadas e lacradas com fita adesiva nas laterais. Na UERJ as placas foram agitadas por 2 min em um agitador de placas de 96 poços (IKA, MS-3). As placas foram incubadas em estufa aquecida a 30°C, por 72 horas. Vale destacar que no Latar este procedimento de homogeneização era realizado manualmente, agitando as placas em movimentos circulares por 2 min na bancada. Após o tempo de incubação, as placas foram retiradas da incubadora e deixadas em repouso por 1 hora antes da leitura. Nesse estágio é possível observar a mudança na coloração dos poços, que passam de amarelo a tons de rosa, e aumento da turbidez nos mesmos, resultado da produção da β -galactosidase e do crescimento da levedura.

A leitura deve ser realizada nos comprimentos de onda de 540 nm, para cor, e 620 nm, para turbidez (ou no comprimento de onda disponível mais próximo destes). No LES a leitura foi realizada em um leitor de placas de 96 poços (Softmax Pro 5, SpectraMax M3) nos comprimentos de onda de 540 e 620 nm. No Latar, a leitura foi realizada nos comprimentos de onda de 490 e 630 nm (ELX800 Universal Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, Inc.).

Após a leitura as placas foram autoclavadas a 121°C por 15 min antes de serem descartadas. Vale lembrar que todo o material envolvido no teste que tenha entrado em contato com a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* foi autoclavado antes do seu descarte.

4.5.5. Análise dos dados do teste YES

Com os valores das leituras de absorbância seguiu-se a construção dos gráficos com as curvas resposta do teste. Inicialmente, corrigiu-se os valores de absorbância, conforme a relação apresentada por Bila (2005):

$$A_{corrigida} = A_{amostra540nm} - (A_{amostra620nm} - A_{branco620nm}) \quad (1)$$

A correção foi feita a cada amostra da curva, calculando-se após a correção a média das duplicatas de cada amostra. Para calcular esta correção, utilizou-se a média das duas fileiras de brancos correspondentes às amostras (linhas B e D ou F e H, resultando na média de 24 amostras de branco, exceto casos indicados onde foi necessário descartar alguma amostra de branco devido a contaminação). Assim, os dados apresentados correspondem à

Assim, calculou-se o valor de Y_{50} , que neste caso corresponde à 50% da máxima resposta obtida, para a curva padrão de 17 β -estradiol:

$$Y_{50} = 50\% \text{maxresposta} = \frac{A-B}{2} + B \quad (2)$$

Em seguida, calculou-se o valor de EC_{50} , pela relação apresentada por Alexander et al (1999):

$$EC_{50} = D - \frac{((A-50\% \text{maxresposta}) \cdot (D-C))}{A-B} \quad (3)$$

Com isto, obteve-se o EC_{50} da curva padrão de 17 β -estradiol. Para calcular o EC_{50} das amostras, realizou-se primeiramente o ajuste dos dados à curva sigmoideal (DE LEAN et al, 1978):

$$y = \frac{(A-B)}{1 + \left(\frac{x_0}{x}\right)^p} + B \quad (4)$$

Onde:

$$p = \frac{A-B}{\log D - \log C} \quad (5)$$

O valor de y corresponde ao valor da absorbância corrigida da amostra (correspondente ao Y_{50} de cada amostra); A corresponde à máxima indução da atividade estrogênica; B corresponde ao limite de detecção; e p é a inclinação do trecho linear da curva (entre A e B). X corresponde ao EC_{50} da amostra, e x_0 corresponde ao EC_{50} da curva padrão de 17 β -estradiol.

Assim, a equação da curva, rearranjada para o cálculo do x é:

$$x = \frac{x_0}{\left(\frac{A-B}{y-B} - 1\right)^{\frac{1}{p}}} \quad (6)$$

Com esta equação pode-se então obter os valores de EC₅₀ das amostras, expressas em equivalentes de estradiol (EQ-E₂). Vale lembrar que as curvas dose-resposta das amostras são construídas em função do fator de diluição das mesmas. Assim, o valor encontrado de x deve ser corrigido por seu fator de diluição correspondente, chegando-se assim ao valor real de EC₅₀ para a amostra.

Para comparar os ensaios entre si, determinou-se a potência relativa estrogênica para cada amostra (BILA, 2005). Esta relação é definida como:

$$PR = \frac{EC_{50curvapadrão}}{EC_{50amostra}} \quad (7)$$

Quanto mais próximo ou maior que 1 o valor de PR, significa que a amostra possui uma maior estrogenicidade. Quanto mais próximo de 0 este valor, significa que a amostra possui menor potencial estrogênico. A determinação da potência relativa em relação ao padrão de 17β-estradiol pode ser considerada como um ensaio biológico indireto. Neste tipo de ensaio assume-se que as amostras analisadas comportem-se como uma diluição ou uma forma mais concentrada do padrão. Assim, esta comparação direta entre as amostras é válida somente sob algumas condições. As curvas dose-resposta do padrão e das amostras devem ser paralelas e a máxima resposta que pode ser atingida por ambas deve ser idêntica. As curvas podem diferenciar em sua posição em relação ao eixo x (devido às amostras estarem mais diluídas ou concentradas), mas devem manter a condição de serem paralelas entre si (VILLENEUVE et al, 2000).

Em algumas amostras observou-se a ocorrência de toxicidade, o que resultou na inibição do crescimento da levedura. Nestas amostras, utilizou-se a relação apresentada por Frische et al (2009), que utilizam o controle da absorbância 620 nm como ferramenta para quantificar a inibição do crescimento da levedura devido à toxicidade das amostras, conforme a relação:

$$toxicidade = 1 - \left(\frac{Abs_{620amostra}}{Abs_{620branco}} \right) \quad (8)$$

Nesta equação, $Abs_{620amostra}$ corresponde à média 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 $Abs_{620branco}$ corresponde à média da leitura de absorbância a 620 nm para as duas linhas de branco (somente etanol) correspondentes à cada amostra analisada em duplicata. Assim, neste cálculo é considerada a média de 24 poços.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 . Implementação do teste YES no LATAR

A primeira etapa do trabalho consistiu na implementação do teste YES no LATAR. Para a implementação do teste, foi realizado treinamento no Laboratório de Engenharia Sanitária (LES) do Departamento de Saneamento e Meio Ambiente da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (DESMA/UERJ), sob a supervisão da Profa. Dra. Daniele Maia Bila. As etapas de realização do teste YES foram apresentadas em 4.5. Teste YES (Yeast Estrogen Screen).

5.1.1 Problemas

Alguns problemas foram observados quando realizou-se o teste YES no Latar. Nos primeiros testes, observou-se que após as 72 horas de incubação as linhas com as amostras de branco (etanol – controle negativo) também apresentavam mudança de cor, ficando cor de rosa como as amostras, como pode ser observado na Figura 7.

Observou-se que até o segundo dia de incubação as amostras de branco ainda estavam amarelas, levemente alaranjadas. No segundo dia, as amostras de 17β -estradiol da curva padrão apresentavam leve mudança de cor, principalmente nas amostras mais concentradas. As amostras menos concentradas ainda permaneciam amarelo-alaranjadas. A mudança de cor ocorria do segundo para o terceiro dia de incubação, quando se observava uma marcante alteração da cor do meio.

Figura 7 – Placa com amostras do teste YES com as linhas de brancos contaminadas. Linhas A e C: curva de 17 β -estradiol, linhas E e G: amostra, linhas B, D, F e H: branco (etanol).

Para tentar identificar as causas do problema de contaminação, inicialmente reviu-se todos os procedimentos de limpeza dos materiais envolvidos no teste. Toda a vidraria utilizada foi limpa novamente, e os meios foram refeitos. Novamente, tomou-se o cuidado de não expor os reagentes a possíveis contaminações que pudessem levar a falsos positivos no teste YES, sendo que novamente todos os cuidados adotados pela Profa. Daniele Bila no LES foram adotados. Nenhuma ponteira foi reutilizada durante a realização dos testes no LATAR, e todas foram limpas antes do uso com água ultrapura e etanol (grau HPLC) e autoclavadas a 121°C por 15 min.

Para eliminar a possibilidade de contaminação cruzada entre os poços, o teste passou ainda a ser realizado em linhas alternadas na placa de 96 poços, como pode ser observado na Figura 8. Não se obteve sucesso com esse procedimento, e em um segundo momento realizou-se o teste com o branco (etanol) isolado da curva de 17 β -estradiol, em placas separadas (Figura 8 a Figura 10), o que também não solucionou o problema de contaminação.

Figura 8 – Placa com o teste YES realizado em linhas alternadas. As linhas A e E correspondem à curva de 17 β -estradiol e as linhas C e G ao branco (etanol).

Figura 9 – Placa com o teste YES realizado em linhas alternadas. As linhas A, C, E e G correspondem à curva de 17 β -estradiol.

Figura 10 - Placa com o teste YES realizado em linhas alternadas. As linhas A, C, E e G correspondem ao branco (etanol).

É importante ressaltar que em todos os testes foi observado o crescimento esperado da *S. Cerevisiae*. O crescimento da levedura é facilmente evidenciado pelo aumento da turbidez nos poços. Observa-se ainda a formação de depósitos da levedura no fundo dos poços, e neste caso, não foi observado ausência de turbidez ou de depósitos em nenhum dos poços.

Nos resultados do teste durante este período, foi possível ainda observar que o resultado da curva de 17 β -estradiol não apresentava-se satisfatório em nenhuma das repetições, apresentando-se bastante distante do apresentado na literatura, como pode ser observado na Figura 11, relativa ao resultado da placa apresentada na Figura 7 (n=2).

Figura 11 – Curva padrão de 17 β -estradiol, referente ao teste YES apresentado na Figura 7.

Observa-se que os valores da absorbância do branco estão muito distantes da absorbância da amostra menos concentrada da curva, fato que não é observado na literatura (ROUTLEDGE AND SUMPTER, 1996; BILA, 2005). Ainda, foi possível observar que a amplitude da faixa de absorbância da curva de 17 β -estradiol, correspondente ao resultado da indução da β -galactosidase, também ficou abaixo do esperado. Bila (2005) observou uma faixa de resposta bastante superior, com os valores de absorbância corrigida das amostras variando entre 1,0 e 3,5.

Este fato pôde ser inicialmente observado visualmente, pois não obteve-se um gradiente de cores marcante nas placas com o teste após o tempo de incubação, sendo que os poços apresentaram um cor de rosa bastante semelhante. Ainda, o branco não ficou da coloração esperada, amarelo-alaranjado. No teste YES, espera-se ainda um gradiente de cores mais marcante, como apresentado por Routledge e Sumpter (1996) e Bila (2005).

Para eliminar a possibilidade de contaminação proveniente da água ultrapura, incubou-se somente o meio que havia restado no tubo Falcon nas linhas que não foram utilizadas da placa de diluição. Na Figura 12 pode-se observar o meio incubado sem o etanol ou amostras, nas linhas que não haviam sido utilizadas na placa de diluição. Observa-se que, em um dos casos, nas duas placas, o meio não apresentou alteração de cor. No entanto, o meio restante em outro tubo falcon apresentou alteração de cor, na mesma batelada de testes.

Figura 12 – Meio de análise incubado sem amostra. Na placa à direita, as linhas E e F correspondem ao meio restante em um tubo falcon e as linhas G e H a outro tubo falcon. Na placa à esquerda as linhas C e D correspondem ao restante de um tubo e F e G a outro.

Este teste também foi realizado incubando-se o meio restante diretamente no tubo falcon, mas os resultados foram inconclusivos novamente. Alguns dos tubos falcon continuaram amarelos, enquanto alguns mudaram para a cor rosa. A hipótese de contaminação pela água ultrapura foi descartada, assumindo-se que, caso a água fosse o problema, nenhuma das linhas com o meio teria permanecido sem alteração de cor.

No próximo passo, testou-se o etanol utilizado como branco nas amostras. O etanol que estava sendo utilizado era o etanol absoluto da Sigma Aldrich[®], e comparou-se este etanol em uso com outro também da Sigma Aldrich[®]. Embora os frascos de etanol fossem do mesmo

lote, um deles encontrava-se lacrado e sem uso até então, o que acusaria uma possível contaminação no frasco em uso. Utilizou-se ainda o etanol de outra marca, Panreac, como comparativo. Entretanto, observou-se alteração de cor para rosa em todos os casos, conforme observado nos testes anteriores. Por isso, a hipótese de problemas com o etanol pôde ser descartada.

Como foi observado que a mudança de cor mais intensa ocorria entre 48 e 72 horas do tempo de incubação, realizou-se um teste com menor tempo. Na Figura 13 estão apresentados os resultados obtidos para a curva e para o branco.

Figura 13 - Teste YES após 54 horas de incubação. À esquerda, as linhas A, C, E e G correspondem à curva de 17β -estradiol. À direita, as mesmas linhas correspondem ao branco (etanol).

Como pode ser observado, a curva não teve um desenvolvimento satisfatório em relação ao esperado, ou seja, não houve completa indução da β -galactosidase. Somente os seis primeiros poços das linhas, correspondentes às maiores concentrações de 17β -estradiol, apresentaram a mudança de cor esperada. Observou-se que na placa com o branco começou a ocorrer mudança de cor. Pela experiência até então, a mudança de cor mais intensa ocorreria nas próximas horas.

Ainda que o branco, visualmente, tenha ficado mais próximo do esperado, os resultados obtidos ainda não foram satisfatórios. Na Figura 14 apresenta-se a curva de 17β -estradiol referente a este teste. Pode-se observar, que não ocorreu a máxima indução da β -galactosidase. A curva, que espera-se ter um padrão sigmoidal, não atingiu o máximo de

indução, e mostrou-se distante do formato sigmoidal. Os valores de absorbância também ficaram muito abaixo do observado com o período de incubação de 72 horas. Nas amostras do branco, com 54 horas de incubação a absorbância corrigida ficou próxima a 0,1 enquanto que com 72 horas de incubação este valor aproximava-se a 0,8. Esta diferença pode ser devida à leitura do teste antes de ocorrer a máxima indução da β -galactosidase e o crescimento satisfatório da *S. cerevisiae*.

Figura 14 – Curva de 17β-estradiol referente ao teste YES apresentado na Figura 13.

O mesmo comportamento de mudança de cor foi observado no meio que sobrou nos tubos Falcon durante os testes. Como tentativa de isolar a fonte do problema de mudança de cor do branco, o meio de análise que sobrou em cada tubo Falcon após sua distribuição nas placas de análise foi incubado juntamente com as placas. A hipótese levantada aqui foi de que se houvesse mudança de cor do meio nas placas com o branco mas não no tubo Falcon, poderia-se concluir que a fonte de contaminação estava nas placas (etanol, amostras ou placas), e não no meio. Entretanto, esta hipótese não se confirmou, pois o tubo Falcon acompanhou a mudança de cor das placas.

Estes foram os principais testes realizados com o objetivo de identificar e solucionar os problemas encontrados durante a implementação do teste YES no Latar. Demais testes realizados estão apresentados na sequência, em detalhes.

5.1.2 Concentração de CPRG (Clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosida)

Durante esta etapa de implementação do teste YES, um dos questionamentos que surgiram foi sobre a concentração de CPRG que deveria ser utilizada. Há diversas adaptações do teste YES, relacionadas principalmente à concentração inicial da levedura e à concentração de CPRG.

Na metodologia de Routledge e Sumpter (1996) adiciona-se em 50 mL do meio de análise 0,5 mL de uma solução 10 mgL^{-1} de CPRG. Apesar da proporção ser a mesma, a metodologia apresentada por Bila (2005) utiliza o CPRG na concentração de 10 mg.mL^{-1} , o que causou o questionamento sobre a concentração de CPRG, e se esta não estaria sendo utilizada em excesso, o que poderia ser uma das possíveis causas para as interferências no teste. Alguns autores, como Vanderperren et al (2001) encontraram evidências de que o CPRG pode interferir nos resultados do teste YES, dependendo da concentração em que é utilizado e de efeitos sinérgicos com outras substâncias presentes nas amostras. Bistan et al (2012) também levantaram a hipótese de interferência dos produtos da degradação do CPRG no teste YES.

Inicialmente, realizou-se o teste YES segundo a metodologia de Bila (2005) com a alteração da concentração de CPRG, que foi reduzida para 10 mgL^{-1} , mantendo-se o volume que é adicionado ao meio de análise. Durante a realização do teste com a concentração de CPRG de 10 mgL^{-1} , observou-se que o meio de análise não apresentou a coloração amarela característica esperada. O meio apresentou um amarelo claro, que permaneceu constante durante o período de incubação. Como pode ser observado na Figura 15, houve o crescimento da levedura após as 72 horas de incubação (demonstrado pelo aumento de turbidez no meio e depósitos no fundo dos poços), mas não observou-se alteração na cor do meio. Assim, o desenvolvimento da cor rosa nas amostras, correspondente à indução da β -galactosidase no teste, não foi observado.

Figura 15 – Teste YES realizado com a concentração de CPRG de 10 mgL^{-1} . As linhas A, C, E e F correspondem à curva de 17β -estradiol após 72 h de incubação.

Realizou-se então o teste YES seguindo a metodologia apresentada por De Boever et al (2001), que também utiliza a solução de CPRG na concentração de 10 mgL^{-1} . No método adaptado de De Boever et al (2001) o CPRG é adicionado às amostras na placa somente após 24 horas de incubação, visando minimizar possíveis interferências que a síntese de subprodutos do CPRG possa provocar na estrogenicidade. Por isso, inicialmente o meio de cultivo com a levedura, apresentando absorvância de 0,1 a 620 nm, é adicionado às placas com a amostra, na quantidade de 150 μL . Após 24 horas de incubação a 28°C adiciona-se 50 μL de uma solução preparada com 4 mL de meio mínimo e 200 μL de CPRG (10 mgL^{-1}) e dá-se continuidade ao período de incubação.

No entanto, também não foram obtidos resultados satisfatórios com o teste adaptado por De Boever et al (2001). Os resultados foram similares aos observados na Figura 15, para o teste realizado segundo a metodologia de Bila (2005) mas com concentração de CPRG menor. Observou-se o crescimento da levedura, mas não houve alteração da cor do meio, que permaneceu amarelo claro.

Assim, a possibilidade de interferência da concentração da solução de CPRG no teste YES realizado no Latar foi descartada, devido aos resultados insatisfatórios encontrados com concentração menor de CPRG.

5.1.3 Identificação das causas dos problemas com o teste YES

Devido aos problemas encontrados no Latar durante a implementação do teste YES, retornou-se ao LES (DESMA/UERJ), por gentileza da Profa. Daniele Bila, para realizar a etapa do trabalho envolvendo o teste YES. Durante o período no LES, tentou-se ainda identificar as causas dos problemas observados no Latar.

Não foi possível levar todos os meios e reagentes utilizados no teste YES para a UERJ para que fossem testados no LES, tanto por limitações de tempo quanto por limitações de transporte. Somente os materiais estéreis e descartáveis utilizados no teste, como as placas, ponteiros e tubos Falcon foram transportados até o LES. O único reagente em comum que foi utilizado na UERJ foi o CPRG, que também foi possível levar do Latar para o LES. Todos os testes realizados no LES apresentaram resultados satisfatórios, isto é, mudança de cor do meio, crescimento da levedura e curva no formato sigmoidal. Logo, as hipóteses de problemas com o CPRG utilizado ou de influência nos resultados devido à concentração de CPRG utilizada foram descartadas.

Como não foi possível levar os reagentes do Latar ao LES, uma quantidade do meio mínimo utilizado no LES foi levado ao Latar, para reproduzir o teste. Também se trouxe a solução de 17β -estradiol utilizada no LES e um repique da levedura.

No Latar, os reagentes diferentes do LES foram a solução de CPRG (já que foi preparada com a água ultrapura do Latar) e o etanol. Nestas condições, o teste apresentou bons resultados no Latar, como pode ser observado nas Figura 16 e 17.

Figura 16 – Teste YES realizado no Latar com o meio de análise do LES. A placa à esquerda corresponde à curva de 17β -estradiol e a placa à direita ao branco (etanol).

Figura 17 - Teste YES realizado no Latar com o meio de análise do LES. As linhas A, C, E e G corresponde à curva de 17β -estradiol e as linhas B, D, F e H ao branco (etanol).

Pode-se observar que as amostras de branco permaneceram sem alteração de cor. A curva apresentou a mudança de cor em degradê, ficando rosa mais forte nas amostras mais concentradas e alaranjado nas amostras menos concentradas.

A curva também mostrou um bom resultado, como observado na Figura 18, com o formato sigmoidal.

Figura 18 – Curva de 17β-estradiol referente à Figura 16, resultado do teste YES realizado no Latar utilizando o meio de análise do LES.

A faixa de absorbância observada nos resultados da Figura 18 não foi tão ampla quanto o observado no LES. Isto pode estar associado ao comprimento de onda em que as amostras foram lidas. O equipamento disponível para a leitura no Latar não tinha o comprimento de onda de 540 e 620 nm. Por isso as amostras foram lidas no comprimento de 490 e 630 nm, que eram os mais próximos disponíveis. Esta diferença pode ter interferido nos resultados, resultando em valores inferiores de absorbância.

Assim, tendo em vista os problemas apresentados e os testes realizados para identificar suas causas, pode-se concluir que a causa das interferências no teste YES realizado no Latar está provavelmente em algum dos reagentes utilizados. Com os bons resultados do teste YES utilizando o meio de cultivo do LES no Latar pode-se descartar as hipóteses de problemas no etanol, no CPRG e na água ultrapura (já que se utilizou água ultrapura do Latar para a solução de CPRG). Apesar de todos os reagentes terem sido adquiridos da Sigma Aldrich® e de todos apresentarem alto grau de pureza, não pode-se descartar a hipótese de que algum deles apresente algum problema que esteja interferindo nos resultados do teste YES.

Outra diferença entre o Latar e o LES foi a concentração da solução de 17β-estradiol. No Latar, utilizou-se uma solução mais concentrada, de $30 \cdot 10^{-8}$ M. Optou-se por esta

concentração por ela ser oito vezes mais concentradas do que a apresentada por Routledge e Sumpter (1996). A solução utilizada pelo LES é cinco vezes mais concentrada 2.10^{-7} M. Esta diferença nas concentrações pode explicar algumas diferenças no comportamento da curva, e para testes futuros, é importante poder comparar estas diferenças. No entanto, esta diferença nas concentrações não justifica a contaminação das amostras de branco.

Devido aos problemas enfrentados no Latar, não houve tempo hábil para identificar e solucionar o problema com o teste YES e com isto concluir a proposta da pesquisa no Latar. Assim, a segunda parte do trabalho, que envolveu os ensaios de oxidação do 17β -estradiol em água, foi realizado parcialmente no LES (DESMA/UERJ), sob supervisão da Profa. Daniele Bila.

5.2. Caracterização da água de estudo

A água utilizada como matriz no estudo foi proveniente do poço artesiano localizado na Área 1 do campus da USP – São Carlos. A coleta foi realizada preferencialmente no dia dos ensaios de cloração e armazenada em frasco de vidro. Quando necessário, a água foi armazenada em frascos de vidro a 4°C , permitindo-se que ficasse à temperatura ambiente no momento dos ensaios.

Na Tabela 4 está apresentada a caracterização da água do poço antes dos ensaios de cloração.

Tabela 4 – Caracterização físico-química da água do poço antes dos ensaios de cloração.

Variável	Média (n=6)	DP (n=6)
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	25,5	1,1
pH	6,2	0,2
Alcalinidade ($\text{mgCaCO}_3\text{L}^{-1}$)	27,2	1,3
Cor (uH)	1,5	1,5
Turbidez (uT)	0,1	0
Condutividade (mS.cm^{-1})	57	3,3

Os mesmos parâmetros foram acompanhados após a cloração, e estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Caracterização físico-química da água do poço após os ensaios de cloração.

Variável	Média (n=6)	DP (n=6)
Temperatura (°C)	25,5	1,1
pH	6,2	0,2
Alcalinidade (mgCaCO ₃ L ⁻¹)	22,5	2,9
Cor (uH)	1,5	1,5
Turbidez (uT)	0,1	0
Condutividade (mS.cm ⁻¹)	107,8	16,5

Pode-se observar que os parâmetros não sofreram grande alteração com a cloração. Isto era esperado, já que se trata de uma matriz com baixa demanda de cloro. O aumento observado da condutividade é explicado pela adição de íons na água após a cloração. Todos os parâmetros analisados foram semelhantes a estudos anteriores, realizados por Pereira (2011).

5.3. Ensaios de cloração – teste YES

Os ensaios de oxidação com cloro e avaliação de estrogenicidade foram realizados no Latar e no LES. No primeiro momento, os ensaios foram feitos no Latar, onde as amostras foram preparadas e extraídas. Todas as análises físico-químicas foram feitas no Latar. A segunda parte desta etapa do trabalho foi conduzida no LES, onde o teste YES foi feito para cinco dos ensaios preparados.

Em cada ensaio de oxidação com o cloro foram obtidas 4 amostras: água do poço (controle), água do poço após oxidação, água do poço com 17 β -estradiol e água do poço com 17 β -estradiol oxidada. Nos dois primeiros casos, as amostras foram analisadas uma única vez. Já as amostras de água do poço com 17 β -estradiol antes e após a oxidação foram preparadas em duplicata.

Entretanto, devido a algumas limitações no momento do teste, realizou-se o ensaio YES para somente uma destas amostras preparadas em duplicata. Em alguns casos indicados (Ensaio 1, 2 e 3), foi necessário repetir o teste por não se ter obtido bons resultados inicialmente. Vale ressaltar que para cada amostra o teste YES foi feito sempre em duplicata. Assim, os resultados aqui apresentados nas curvas dose-resposta são resultantes da média da duplicata realizada.

Em seguida, apresentam-se os resultados obtidos nesta etapa do trabalho, que serão discutidos em conjunto, para uma visão geral dos resultados obtidos.

5.3.1 Consumo de cloro

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados obtidos para o consumo de cloro durante os ensaios de oxidação com cloro.

Tabela 6 – Concentração de cloro residual para os ensaios realizados.

Ensaio	Concentração de 17β-estradiol	Tempo de contato	Concentração de cloro aplicada (mgL⁻¹)	Concentração de cloro total residual (mgL⁻¹)
1	1000 ngL ⁻¹	30 min	1	1
2	100 μ gL ⁻¹		1	0,91
3	500 ngL ⁻¹		1	0,82
4	500 ngL ⁻¹		2	1,83
5	1000 ngL ⁻¹		2	1,94

O resultado do controle dos ensaios, a água do poço, está apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 - Concentração de cloro residual para as amostras controle nos ensaios realizados.

Ensaio	Tempo de contato	Concentração de cloro aplicada (mgL ⁻¹)	Concentração de cloro total residual (mgL ⁻¹)
1	30 min	1	0,96
2		1	0,97
3		1	0,97
4		2	1,86
5		2	1,99

Observa-se que não houve grande consumo de cloro, o que era esperado dado as características da água de estudo. A água do poço utilizada não apresentava alta demanda de cloro, como já observado por Pereira (2011), o que justifica o baixo consumo observado. O cloro aplicado permaneceu, desta forma, disponível para a oxidação do 17 β -estradiol.

5.3.2 Curva padrão de 17 β -estradiol

Na Figura 19 estão apresentados os resultados obtidos para a curva padrão de 17 β -estradiol obtida na UERJ. Observa-se nas linhas A e C o desenvolvimento da coloração rosa nas amostras, resultado da síntese da β -galactosidase. Observa-se que as amostras de branco, linhas B, D, F e H, continuaram com a cor amarela característica do meio de análise, conforme esperado. A curva abrangeu as concentrações de $2 \cdot 10^{-7}$ a $9,77 \cdot 10^{-11}$ M ($54,48 \mu\text{gL}^{-1}$ a $0,27 \text{ ngL}^{-1}$).

Figura 19 – Placa com resultado para a curva de 17β-estradiol (linhas A e C).

A curva padrão de 17β-estradiol resultante dos ensaios na UERJ está apresentada na Figura 20. Pode-se observar o formato sigmoidal da curva, o que atende ao esperado. Obteve-se uma ampla faixa de absorbância resultante, o que era esperado e está de acordo com os resultados obtidos por Bila (2005).

Figura 20 – Curva padrão de 17β-estradiol (resultados referentes à Figura 19).

Conforme apresentado em 4.5.5 Análise dos dados do teste YES, seguiu-se ao EC_{50} da curva e do seu ajuste. Para tanto, foram adotados os seguintes valores, segundo a curva apresentada na Figura 20:

Máxima indução da β -galactosidase (A): 2,49

Limite de detecção (B): 1,01

C: $1,06 \cdot 10^{-7} \text{ gL}^{-1}$

D: $8,5 \cdot 10^{-7} \text{ gL}^{-1}$

Assim, resultou-se no valor calculado de Y_{50} de 1,75, e valor para o EC_{50} de $0,48 \mu\text{gL}^{-1}$.

Realizou-se então o ajuste dos dados à equação da curva (DE LEAN et al, 1978; BILA 2005), Encontrou-se para p o valor de 1,63, o que resultou no seguinte ajuste da curva:

$$x = \frac{0,48}{\left(\frac{1,48}{y - 1,01} - 1\right)^{\frac{1}{1,63}}}$$

Desta curva foram calculados os valores de EC_{50} das amostras obtidas em cada ensaio. Quanto ao valor de EC_{50} obtido para a curva de 17β -estradiol, de $0,48 \mu\text{gL}^{-1}$ ($1,7 \cdot 10^{-9} \text{ M}$), observa-se que este valor é inferior ao encontrado por Bila (2005), de $2,13 \mu\text{gL}^{-1}$ ($7,8 \cdot 10^{-9} \text{ M}$).

Gaido et al (1997) encontraram para a curva padrão de 17β -estradiol EC_{50} de $2,25 \cdot 10^{-10} \text{ M}$. Beresford et al (2000) encontraram valor de EC_{50} semelhante, de $2,2 \pm 0,22 \cdot 10^{-10} \text{ M}$. Beck et al (2006) também obtiveram o EC_{50} nesta faixa, de $1,8 \cdot 10^{-10} \text{ M}$.

Ao comparar com o resultado obtido por outros autores, é possível ver que o valor encontra-se ligeiramente abaixo da ordem de grandeza esperada para o teste YES. Entretanto, a concentração encontra-se próxima à encontrada por Bila (2005). Como apresentado por Beresford et al (2000), alguns fatores influenciam no EC_{50} da curva de 17β -estradiol, entre eles o número inicial de células de levedura no ensaio e o tempo de incubação. Assim, esta diferença entre os valores de EC_{50} encontrado e relatados na literatura pode ser explicada por

uma provável variação no tempo de incubação e no número inicial de células da levedura, que neste caso tornaram o ensaio menos sensível.

Inicialmente, serão apresentados os resultados obtidos para cada ensaio realizado, e a discussão dos resultados de cada um em específico. Então, em seguida, será realizada a comparação e discussão em conjunto dos dados obtidos.

5.3.3 Ensaio 1

Neste primeiro ensaio, foram estudadas as seguintes condições:

Concentração de 17β -estradiol: 1000 ngL^{-1}

Concentração de cloro aplicada: $1,0 \text{ mgL}^{-1}$

Tempo de contato: 30 min

Os resultados obtidos para as amostras água do poço antes e após a oxidação com cloro estão apresentados na Figura 21.

Figura 21 – Curvas dose-resposta para as amostras de água do poço antes e após a cloração no ensaio 1.

Os resultados obtidos para as amostras com 17β -estradiol antes e após a oxidação com cloro estão apresentados na Figura 22.

Figura 22 - Curvas dose-resposta para as amostras de água do poço antes e após a cloração no ensaio 1.

Na Figura 22 observa-se que a curva apresentando o resultado do teste YES para a amostra extraída de água com 17β -estradiol antes da oxidação com cloro não apresentam resultados condizentes com o esperado. No caso desta amostra, e como foi observado algumas vezes durante esta etapa do trabalho, observou-se alguns problemas nos resultados do teste. O primeiro foi a ausência ou número reduzido da levedura nos poços com amostras mais concentradas após as 72 h de incubação. Como pode ser observado na placa apresentada na Figura 23, todas as amostras, mesmo as menos concentradas, apresentaram coloração bastante intensa.

Figura 23 – Placa com o resultado da amostra de água do poço com 17 β -estradiol para o ensaio 1. As linhas E e G são correspondentes à esta amostra.

Nas amostras mais concentradas, observou-se que ocorreu a inibição do crescimento da levedura, o que fica visível quando observa-se o fundo da placa. Na fotografia à direita apresentada na Figura 23 observa-se claramente a ausência da levedura nos poços. Quando as amostras encontravam-se menos concentradas, observou-se que a levedura pôde crescer conforme o esperado. Este comportamento também foi observado em algumas amostras nos demais ensaios.

Alguns estudos, como os conduzidos por Beck et al (2006), Beresford et al (2000) e Bistan et al (2011) também observaram inibição do crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*, o que é regularmente associado à presença de toxicidade na amostra estudada. Este comportamento é mais frequente quando analisam-se amostras extraídas de efluente de esgoto sanitário, como é o caso de Bistan et al (2011).

No LES, onde os testes foram conduzidos, também foi relatado a inibição do crescimento da levedura com outras amostras. Neste caso, o resultado foi sempre associado à presença de toxicidade nas amostras (Bila, dados não publicados).

Frische et al (2009) utilizam o controle da absorbância 620 nm como ferramenta para quantificar a inibição do crescimento da levedura devido à toxicidade das amostras, conforme a relação:

$$\text{toxicidade} = 1 - \left(\frac{Abs_{620\text{amostra}}}{Abs_{620\text{branco}}} \right) \quad (9)$$

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados desta relação para as diluições onde se observou a inibição do crescimento da levedura.

Tabela 8 – Estimativa da toxicidade para as amostras com inibição do crescimento da levedura do Ensaio 1.

Fator de diluição	1	5.10^{-1}	$2,5.10^{-1}$	$1,25.10^{-1}$	$6,25.10^{-2}$	$3,13.10^{-2}$	$1,56.10^{-2}$	$7,81.10^{-3}$	$3,91.10^{-3}$
Água do poço oxidada	0,85	0,72	0,10	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.
Água com E2	0,82	0,77	0,73	0,71	0,73	0,72	0,72	0,57	N.O.

Legenda: N.O. = Não observado

Observa-se que a amostra mais concentrada, do primeiro poço, nos dois casos apresentados, foi a que mais provocou a inibição do crescimento em relação ao branco, que chegou a 0,85 (85%) para a água do poço oxidada, ou seja, o crescimento da levedura foi 85% inferior ao observado para o branco (somente etanol).

Este resultado não era esperado, principalmente no caso da água com 17β -estradiol. Por se tratar de água de poço, não esperava-se que houvesse a presença de compostos que pudessem interferir no teste YES, conferindo toxicidade a ele. Esta questão será mais discutida posteriormente, em conjunto com os resultados dos demais ensaios.

Conforme apresentdo nas Figuras 21 e 22, pode-se observar que somente as curvas correspondentes às amostras extraídas da água do poço e da água com 17β -estradiol oxidada aproximaram-se do resultado esperado para o teste YES, isto é, curva com formato sigmoidal. Vale destacar que somente a curva da amostra extraída da água com 17β -estradiol oxidada aproximou-se da situação ideal esperada, que é o formato sigmoidal e a faixa de resposta de absorbância semelhante à da curva padrão. Entretanto, as curvas não apresentam condição de paralelismo.

Embora as curvas não tenham atingido as condições ideais, calculou-se os valores de EC_{50} e PR para todas as amostras, como forma de mensurar a alteração na estrogenicidade causada pela cloração, mesmo que como uma estimativa. Ainda que não seja a situação ideal, alguns autores, como Finney (1965), consideram que estas condições dificilmente são atingidas quando matrizes reais são estudadas, o que justifica o cálculo de EC_{50} e PR mesmo que as condições de similaridade não sejam atingidas.

Na Tabela 9 estão apresentados estes valores, expressos em EQ-E₂, para o Ensaio 1.

Tabela 9 – Valores de EC₅₀ e potência relativa para o Ensaio 1.

Ensaio 1	Água do poço	Água do poço oxidada	Água com 17β-estradiol	Água com 17β-estradiol pós-oxidação
EC ₅₀ (EQ-E ₂ , µg L ⁻¹)	1,0	-	-	17,6
Potência relativa (PR)	0,47	-	-	0,027

Legenda: - : Não pode ser calculado.

Destaca-se que o valor de EC₅₀ para a água do poço não pode ser calculado, pois a faixa de resposta obtida desta amostra estava abaixo do mínimo da curva padrão. Ainda, o formato da curva confere uma resposta bastante inferior ao formato sigmoidal. Com isto, pode-se inferir que a estrogenicidade, no caso desta amostra, não é quantificável pelo teste YES aplicado. No caso da amostra de água com 17β-estradiol, o valor não foi calculado devido à grande discrepância da curva obtida com o resultado esperado, o que levaria ao cálculo de valores bastante distantes da realidade.

Observa-se que, neste ensaio, a amostra que resultou num menor valor de EC₅₀, e portanto, maior estrogenicidade foi a água do poço. Este resultado não era esperado, visto que, segundo estudos anteriores (PEREIRA, 2011), a água do poço da USP poderia ser considerada isenta de estrogenicidade. Por sua vez, a não possibilidade de quantificação do EC₅₀ da água do poço após a cloração leva à indicação de que a cloração provocou a redução da estrogenicidade na água.

Não é possível, neste ensaio, traçar delineamentos sobre a influência da cloração na estrogenicidade da água do poço reforçada com 17β-estradiol, já que os resultados obtidos com o teste YES não permitiram que todos os valores necessários fossem calculados.

5.3.4 Ensaio 2

Os resultados deste ensaio apresentaram vários problemas nas curvas dose-resposta do teste YES das amostras extraídas de água com 17β-estradiol antes e após a cloração. As amostras deste ensaio foram submetidas ao teste YES duas vezes, em dias diferentes. Nas

duas ocasiões observou-se problemas com o teste, sendo que aqui estão apresentados os resultados referentes à repetição com melhores resultados. Inicialmente, serão apresentados os resultados para as amostras de água do poço antes e após a oxidação, e então os resultados das amostras com 17 β -estradiol que apresentaram problemas.

As condições estudadas neste ensaio foram:

Concentração de 17 β -estradiol: 100 μgL^{-1}

Concentração de cloro aplicada: 1,0 mgL^{-1}

Tempo de contato: 30 min

Os resultados para as amostras de água do poço antes e após a cloração estão apresentados na Figura 24.

Figura 24 – Curvas dose-resposta para as amostras de água do poço antes e após a cloração no ensaio 2.

Nestas duas amostras observa-se que houve uma boa resposta do teste YES. A faixa de absorbância, apesar de ainda inferior, aproxima-se daquela observada na curva padrão. À exceção de um ponto em cada curva que encontra-se mais deslocado, nas diluições maiores, o formato obtido atende ao sigmoidal esperado.

Neste caso, foi possível calcular os valores de EC_{50} e PR, que estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Valores de EC_{50} e potência relativa para o Ensaio 2.

Ensaio 2	Água do poço	Água do poço oxidada
EC_{50} (EQ- E_2 , $\mu\text{g L}^{-1}$)	6,8	154,43
Potência relativa	0,07	0,003

Observa-se que os valores diferem bastante daqueles encontrados para a água do poço no ensaio 1 (Tabela 9). Neste caso, a água do poço foi novamente a amostra que apresentou o menor valor de EC_{50} , causando portanto maior estrogenicidade. Novamente, o aumento do valor de EC_{50} e a redução da potência relativa observado para água após a cloração indicam que este processo foi eficaz na oxidação de compostos estrogênicos e na redução da estrogenicidade na água. Mais uma vez, entretanto, não se esperava a resposta de atividade estrogênica para a água do poço.

Para as amostras de água com 17β -estradiol antes e após a oxidação, foram observados problemas nas curvas dose-resposta do teste YES. Os resultados obtidos com o teste YES para estas amostras estão apresentados na Figura 25. Destaca-se que as amostras deste ensaio foram submetidas em duplicata ao teste YES, fornecendo resultados semelhantes nas duas ocasiões, sendo que são apresentados os melhores resultados obtidos.

Figura 25 – Resultado do teste YES do Ensaio 2. As linhas E e G da placa à esquerda correspondem à amostra de água com 17β -estradiol e as linhas E e G da placa à direita correspondem à amostra de água com 17β -estradiol oxidada.

Na placa observou-se que todos os poços ficaram com coloração muito intensa. Especialmente na placa apresentada à esquerda na Figura 25 pode-se observar que, ao contrário do esperado, as amostras mais concentradas apresentaram uma coloração mais fraca do que as amostras menos concentradas. Esta diferença ficou clara na curva dose-resposta apresentada na Figura 26.

Pode-se observar que os resultados estão bem distantes da curva dose-resposta esperada para o teste YES. Em ambas as repetições do teste YES observou-se o mesmo comportamento para as amostras.

Figura 26 – Curva dose-resposta para as amostras de água com 17β-estradiol antes e após a oxidação.

Novamente nestas amostras observou-se a inibição do crescimento da levedura. Os valores resultantes da relação de toxicidade com a absorbância a 620 nm estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 11 – Estimativa da toxicidade para as amostras com inibição do crescimento da levedura do Ensaio 2.

Fator de diluição	1	5. 10 ⁻¹	2,5. 10 ⁻¹	1,25. 10 ⁻¹	6,25. 10 ⁻²	3,13. 10 ⁻²	1,56. 10 ⁻²	7,81. 10 ⁻³	3,91. 10 ⁻³	1,95. 10 ⁻³	9,77. 10 ⁻⁴	4,88. 10 ⁻⁴
Água com E2	0,70	0,66	0,71	0,64	0,63	0,68	0,63	0,66	0,53	0,47	0,42	0,28
Água com E2 oxidada	0,75	0,66	0,63	0,70	0,66	0,61	0,58	0,64	0,65	0,53	0,37	0,23

Novamente, observou-se maior inibição nos poços com amostras mais concentradas (com menor diluição). Neste caso, diferentemente do ensaio 1, observou-se que até nos últimos poços da linha, ou seja, aqueles com maior diluição, ocorreu inibição do crescimento da levedura. Vale destacar que este é o ensaio em que foi utilizada a maior concentração de 17 β -estradiol (100 μgL^{-1}), o que pode estar ligado aos resultados observados.

5.3.5 Ensaio 3

Neste ensaio obteve-se respostas abaixo do esperado, quando comparado com os demais.

As condições estudadas neste ensaio foram:

Concentração de 17 β -estradiol: 500 ngL^{-1}

Concentração de cloro aplicada: 1,0 mgL^{-1}

Tempo de contato: 30 min

Na Figura 27 estão apresentados os resultados para a água do poço e água do poço oxidada para este ensaio.

Figura 27 - Curvas dose-resposta para as amostras de água do poço antes e após a cloração no ensaio 3.

No caso destas amostras, a curva se distanciou bastante do formato sigmoidal esperado. Pode-se observar, entretanto, que houve o crescimento esperado da levedura nas placas, e o desenvolvimento da coloração rosa conforme observado nas demais amostras e conforme apresentado na literatura. Assim, nestas amostras pode-se observar que a resposta ao teste foi baixa, o que sugere que as amostras não possui níveis de estrogenicidade quantificáveis pelo teste YES. Este resultado é condizente com o esperado para a água do poço, como observado em estudos anteriores (PEREIRA, 2011). Entretanto, difere do resultado obtido nos testes anteriores. Esta diferença observada entre este ensaio e os demais será discutida posteriormente, em conjunto com os dados de todos os ensaios.

Na Figura 28 estão apresentados os resultados para as amostras de água com 17 β -estradiol antes e após a oxidação.

Figura 28 - Curvas dose-resposta para as amostras de água com 17 β -estradiol antes e após a cloração no ensaio 3.

Neste ensaio novamente foram observados problemas com o crescimento da levedura. Na Figura 29 estão apresentadas as fotografias das placas com as curvas dose-resposta apresentadas na Figura 28.

Figura 29 – Placas com os resultados do teste YES para a Figura 28..As linhas A e C da placa à esquerda correspondem à amostra extraída de água com E2 e as linhas E e G da placa à direita correspondem à amostra de água com E2 oxidada.

No caso destas curvas, observou-se novamente a inibição do crescimento da levedura. As amostras apresentadas na placa à direita da Figura 29 apresentaram inibição ou morte da levedura nas amostras mais concentradas. Isto é claramente observado no gráfico, já que os pontos correspondentes à estas diluições apresentam resposta inferior à de amostras mais diluídas. Assim como observado no Ensaio 1, foi obtido um resultado mais próximo da curva

dose-resposta esperada para as amostras mais diluídas. Os dados de toxicidade, devido à inibição estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Estimativa da toxicidade para as amostras com inibição do crescimento da levedura do Ensaio 3.

Fator de diluição	1	5. 10 ⁻¹	2,5. 10 ⁻¹	1,25. 10 ⁻¹	6,25. 10 ⁻²	3,13. 10 ⁻²	1,56. 10 ⁻²	7,81. 10 ⁻³	3,91. 10 ⁻³	1,95. 10 ⁻³	9,77. 10 ⁻⁴
Água com E2	0,80	0,74	0,56	0,04	0,02	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.
Água com E2 oxidada	0,17	0,22	0,19	0,22	0,16	0,18	0,29	0,06	0,21	0,04	0,21

Legenda: N.O. = Não observado

A inibição neste caso foi mais acentuada nas amostras mais concentradas da água com 17β-estradiol, principalmente nos 3 primeiros poços da linha de análise. No caso da água com 17β-estradiol oxidada, observou-se uma redução na inibição, ou seja, toxicidade inferior. No caso do Ensaio 2, não foi possível calcular os valores de EC₅₀ e de PR para todas as amostras, pois a resposta obtida impossibilita o cálculo pela equação. A única amostra possível de estimar estes valores, ainda que com incertezas foi a de água com 17β-estradiol oxidada, que resultou em EC₅₀ de 110,5 µg L⁻¹ (EQ-E₂) e PR de 0,004.

Apesar de não ser possível comparar diretamente os valores de PR e EC₅₀ neste caso do ensaio 3, a redução da toxicidade, observada pela redução da inibição do crescimento da levedura na amostra de água do poço com 17β-estradiol oxidada pode ser um indicativo de que o processo de cloração auxiliou na oxidação de compostos tóxicos à levedura nesta amostra.

5.3.6 Ensaio 4

Neste ensaio, foram estudadas as seguintes condições:

Concentração de 17β-estradiol: 500 ng L⁻¹

Concentração de cloro aplicada: 2,0 mg L⁻¹

Tempo de contato: 30 min

Os resultados obtidos para as amostras extraídas antes e após a oxidação com cloro estão apresentados nas Figuras 30 e 31.

Figura 30 - Curvas dose-resposta para as amostras de água do poço antes e após a cloração no ensaio 4.

Figura 31 - Curvas dose-resposta para as amostras de água com 17β-estradiol antes e após a cloração no ensaio 4.

Neste ensaio observou-se novamente algumas características de inibição do crescimento da levedura na amostra de água com 17 β -estradiol. Os valores da relação de toxicidade estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Estimativa da toxicidade para as amostras com inibição do crescimento da levedura do Ensaio 4.

Fator de diluição	1	5.10⁻¹	2,5.10⁻¹	1,25.10⁻¹	6,25.10⁻²	3,13.10⁻²	1,56.10⁻²
Água com E2	0,70	0,72	0,73	0,62	0,63	0,44	0,28
Água com E2 oxidada	0,13	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.

Legenda: N.O. = Não observado

Nesta amostra observou-se mais uma vez o efeito da toxicidade das amostras no crescimento da levedura. Novamente, pode-se observar, pela Figura 31, que a indução da β -galactosidase foi afetada, ocorrendo uma menor resposta em amostras mais concentradas no caso da água com 17 β -estradiol. Neste ensaio vale destacar que ocorreu uma leve inibição do crescimento da levedura na amostra de água com 17 β -estradiol sem diluição.

Os valores encontrados para EC₅₀ e PR deste ensaio estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Valores de EC₅₀ e potência relativa para o Ensaio 4.

Ensaio 4	Água do poço	Água do poço oxidada	Água com 17β-estradiol	Água com 17β-estradiol pós-oxidação
EC ₅₀ (EQ-E ₂ , $\mu\text{g L}^{-1}$)	1,3	11,16	-	24,5
Potência relativa	0,38	0,043	-	0,020

Neste ensaio, o menor valor de EC₅₀ novamente foi encontrado para a amostra de água do poço, o que significa que esta foi a amostra que elucitou a maior atividade estrogênica no

teste YES. Após a cloração, o EC₅₀ foi superior, com menor potência relativa, e portanto menor estrogenicidade.

Novamente, não é possível comparar os valores de PR e EC₅₀ para a amostra de água com 17 β -estradiol antes e após a oxidação, já que o cálculo do EC₅₀ para a amostra antes da oxidação com a curva no formato obtido levaria a erros de interpretação.

5.3.7 Ensaio 5

Neste ensaio, foram estudadas as seguintes condições:

Concentração de 17 β -estradiol: 1000 ngL⁻¹

Concentração de cloro aplicada: 2,0 mgL⁻¹

Tempo de contato: 30 min

Os resultados obtidos para as amostras extraídas antes e após a oxidação com cloro estão apresentados na Figura 32.

Figura 32 – Curvas dose-resposta para as amostras de água do poço antes e após a cloração no ensaio 5.

Os resultados obtidos para as amostras com 17β -estradiol antes e após a oxidação com cloro estão apresentados na Figura 33.

Figura 33 - Curvas dose- resposta para as amostras de água do poço antes e após a cloração no ensaio 5.

Assim como observado nos ensaios anteriores, os resultados mostram que houve problemas na resposta do teste YES. Novamente, observou-se que ocorreu inibição do crescimento da levedura nas amostras mais concentradas. Os valores de toxicidade estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Estimativa da toxicidade para as amostras com inibição do crescimento da levedura do Ensaio 5.

Fator de diluição	1	$5 \cdot 10^{-1}$	$2,5 \cdot 10^{-1}$	$1,25 \cdot 10^{-1}$	$6,25 \cdot 10^{-2}$	$3,13 \cdot 10^{-2}$	$1,56 \cdot 10^{-2}$	$7,81 \cdot 10^{-3}$
Água com E2	0,67	0,69	0,69	0,66	0,53	0,26	0,11	N.O.

Legenda: N.O. = Não observado

Assim como nos demais ensaios, a água com 17β -estradiol extraída não apresentou uma curva dose-resposta satisfatória por problemas de inibição no crescimento da levedura nas amostras mais concentradas. Isto é facilmente observado na Figura 33 e Tabela 15, onde observa-se a maior inibição do crescimento da levedura devido à toxicidade da amostra. Tal

comportamento sugere que, em amostras menos concentradas, ou seja, com um fator de diluição maior, a curva dose-resposta se aproximaria mais do formato sigmoidal esperado. Por limitações de tempo e materiais não foi possível repetir o teste nestas condições.

Neste ensaio observou-se que as demais curvas, de água do poço, água do poço oxidada e água do poço com 17 β -estradiol oxidada apresentaram um resultado bastante satisfatório em comparação com os demais ensaios, em relação ao formato sigmoidal esperado e em relação ao paralelismo da curva padrão de 17 β -estradiol. Além disso, a faixa de resposta de absorbância foi a que mais se aproximou dos resultados obtidos para a curva padrão

Os valores de EC₅₀ e PR para as amostras em que foi possível este cálculo estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Valores de EC₅₀ e potência relativa para o Ensaio 5.

Ensaio 5	Água do poço	Água do poço oxidada	Água com 17 β -estradiol	Água com 17 β -estradiol pós-oxidação
EC ₅₀ (EQ-E ₂ , $\mu\text{g L}^{-1}$)	3,3	13,95	-	12,1
Potência relativa	0,15	0,034	-	0,039

Neste ensaio, o menor valor de EC₅₀ novamente foi encontrado para a amostra de água do poço, o que significa que esta foi a amostra que elicitou a maior atividade estrogênica no teste YES. Após a cloração, o EC₅₀ foi superior, com menor potência relativa, e portanto menor estrogenicidade.

5.3.8 Discussão dos resultados obtidos - Resposta e problemas observados no teste YES

Nos ensaios apresentados, foram observados alguns problemas nas curvas dose-resposta do teste YES. O principal problema encontrado, e que ocorreu em todos os ensaios, foi a resposta fora do esperado para as amostras com 17 β -estradiol mais concentradas. Nestas amostras, observou-se a inibição do crescimento da levedura, e até a

ausência de células nos poços após o período de incubação. As curvas não se assemelharam ao formato sigmoidal, e apresentaram um comportamento bastante distante do esperado quando comparado com a curva dose-resposta do 17β -estradiol.

Nas Figuras 34 a 38 pode-se observar um comparativo entre os resultados de cada ensaio com a curva padrão.

Figura 34 – Curvas dose-resposta para o Ensaio 1.

Figura 35 – Curvas dose-resposta para o Ensaio 2.

Figura 36 – Curvas dose-resposta para o Ensaio 3.

Figura 37 - Curvas dose-resposta para o Ensaio 4.

Figura 38 - Curvas dose-resposta para o Ensaio 5.

Nas Figuras 34 a 38 fica claro o distanciamento entre os resultados obtidos com o esperado conforme a literatura apresenta, como o apresentado na Figura 3 (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996; BILA, 2005). Os Ensaios 4 e 5 são aqueles que apresentaram os resultados mais próximos do esperado, em relação à resposta esperada para o teste YES. Um resultado que chama atenção é o valor de EC_{50} encontrado para a curva padrão, de $1,7 \cdot 10^{-9}$ M que é superior ao relatado na literatura.

No geral, alguns fatores podem ser apontados como possíveis causas destes resultados. Como apresentado por Beresford et al (2000), o número inicial de células de levedura influencia na sensibilidade do teste, sendo que quanto maior este número, maior a sensibilidade do teste, ou seja, menor o valor de EC_{50} . Ainda, o tempo de incubação é apontado como um dos fatores interferentes no teste. Um menor tempo de incubação reduz a indução da β -galactosidase, ou seja, obtém-se valores superiores de EC_{50} .

Nos testes realizados neste trabalho, pode-se levantar a hipótese de alterações no número inicial de levedura no meio de análise e de eventuais variações no tempo de incubação das placas. Devido a limitações de tempo, decorrentes do tempo de preparação do material para o teste e do tempo de leitura dos resultados, muitas amostras foram submetidas ao teste no mesmo dia. A realização do teste YES foi dividida em 2 etapas, sendo que no segundo dia de testes foi necessário repetir algumas amostras do primeiro dia. Por isso, no segundo dia de testes, foram feitas 19 placas com amostras. Esta é uma grande quantidade de placas para serem feitas, e por isso foram necessárias mais de 8 horas para que todas elas ficassem prontas. A curva padrão de 17β -estradiol foi a última placa a ser preparada, o que implicou em uma diferença de tempo entre ela e as demais.

No momento da leitura das placas não foi possível considerar a diferença de tempo de incubação entre as placas, por limitação na disponibilidade do equipamento. Assim, todas as placas foram lidas no mesmo horário, o que pode ter sido um fator que contribuiu na redução do tempo de incubação da curva padrão. Houve uma diferença de 6 a 8 horas a menos no tempo de incubação das placas, o que pode ter tido como consequência um valor de EC_{50} para a curva padrão superior ao relatado na literatura (BILA, 2005).

Assim, estes dois fatores (número inicial de levedura e tempo de incubação) são causas possíveis para a diferença observada na sensibilidade do teste e aos resultados da curva padrão de 17β -estradiol.

Em relação aos resultados obtidos para as amostras, outras hipóteses podem ser levantadas. Analogamente, estes dois fatores, tempo de incubação e número inicial de células, podem ter interferido nos resultados obtidos, especialmente na questão da faixa de resposta de absorbância observada para as amostras. Os Ensaios 4 e 5, apresentados na Figura 37 e Figura 38, foram os que apresentaram os melhores resultados para as amostras de água do poço, água de poço oxidada e água com 17 β -estradiol oxidada. Pode-se observar que estas foram as curvas que melhor atenderam à condição de paralelismo em relação à curva padrão e também que tiveram a maior faixa de resposta de absorbância. Finney (1965), Chang (1975) e De Lean et al (1978) ressaltam que esta é uma condição necessária para a determinação do EC₅₀ e da potência relativa em bioensaios indiretos. Ainda, a mesma faixa de resposta (absorbância) é necessária, visto que isto indica que houve a total indução da β -galactosidase (FINNEY, 1965, VILLENEUVE et al, 2000). Nos ensaios apresentados, todas as curvas obtidas podem ser classificadas como submáximas, que não atingiram a máxima resposta da β -galactosidase (BERESFORD et al, 2000).

Algumas das causas para esta resposta são citadas por Beresford et al (2000), e podem ser tanto o tempo de incubação reduzido bem como a influência do número inicial de levedura no meio de análise. Entretanto, outro fator importante interfere na resposta, que é a inibição do crescimento da levedura durante o período de incubação. A inibição do crescimento da levedura, levando à ausência da mesma ou a um número reduzido dela após a incubação pode ter sido causada principalmente pela presença de algum composto que causou toxicidade à amostra. Este comportamento frente à toxicidade das amostras foi observado por Beresford et al (2000), Hamblen et al (2003) e Frische et al (2009).

Inicialmente, no caso das amostras de água do poço (antes e após a cloração) e água do poço com 17 β -estradiol, não era esperado a presença de toxicidade ou de compostos que interferissem no teste YES, por tratar-se de água proveniente de poço, sem relatos de contaminação, utilizada no abastecimento do campus de São Carlos da Universidade de São Paulo. Estudos anteriores, realizados por Pereira (2011) contemplaram a quantificação do 17 β -estradiol nesta mesma matriz, antes e após a cloração, com HPLC-Flu e a análise dos efeitos de ecotoxicidade em um teste in vivo com peixes *Danio rerio* (PEREIRA, 2011). Os resultados não acusaram a presença de estrogenicidade, bem como isentaram a água do poço da presença de 17 β -estradiol. Assim, também em relação às amostras de água do poço reforçadas com 17 β -estradiol, não se esperava a presença de compostos que pudessem

provocar citotoxicidade e interferir no resultado do teste, já que tratava-se somente da água reforçada com o 17 β -estradiol (preparo em solução estoque com etanol absoluto).

O único dos ensaios em que as amostras de água do poço antes e após a cloração não provocaram atividade estrogênica possível de ser quantificada foi no ensaio 2, mas não foi possível levantar hipóteses em relação a esta diferença observada.

Somente para as amostras de água do poço com 17 β -estradiol após a cloração era esperado que pudesse ocorrer alguma alteração na resposta do teste YES, já que de acordo com Pereira (2011), foi observado a presença de compostos que causaram toxicidade ou estrogenicidade neste caso, já que observou-se a formação de subprodutos da cloração do 17 β -estradiol que causaram efeito estrogênico nos testes realizados com peixes.

Algumas hipóteses podem ser levantadas em relação aos problemas observados. Uma delas é a influência do processo de extração no teste YES. Alguns autores, como Citulski e Farahbakhsh (2012), apresentam que o procedimento de extração em fase sólida pode influenciar nos resultados do teste, já que pode ocorrer a co-extração de compostos que causam toxicidade na extração por fase sólida das amostras. Entretanto, este problema é mais observado em amostras fortemente contaminadas ou com a presença de biosólidos, como é o caso de amostras de esgoto ou de lodo, e por isso algumas amostras requerem etapas adicionais de purificação além do clean up na extração em fase sólida (ALDA E BARCELÓ, 2001; CITULSKI E FARAHBAKHS, 2012). A fase de clean up, uma das que reduzem este problema, não foi contemplada no método utilizado neste trabalho.

Apesar das diferenças entre as análises com biosólidos e com água de abastecimento, pode-se levantar esta como uma hipótese para a explicação dos resultados obtidos com o teste YES neste trabalho. Estudos adicionais são necessários para obter mais dados sobre a relação entre o método de extração empregado e os resultados do teste YES para as amostras estudadas. Uma das maneiras de se realizar isto é incluir a análise de uma amostra de água ultrapura, submetida ao mesmo processo de extração, como controle (PAWLOWSKI et al, 2003). Este controle durante os ensaios poderia indicar se ocorre algum processo de contaminação durante o processo de extração que não está sendo identificado.

Vale destacar que este método de extração SPE empregado foi utilizado por Bila (2005) em amostras de efluente de Estação de Tratamento de Esgoto e com água ultrapura

reforçada com 17 β -estradiol, e não foram observados efeitos tóxicos durante a análise das amostras com o teste YES. Um método semelhante de extração foi adotado por Pereira (2011), também em cartucho C-18 e com o mesmo procedimento de condicionamento do cartucho, mas contemplando a fase de clean up. O método adotado por Pereira (2011) foi utilizado com a mesma matriz deste estudo, para quantificação do 17 β -estradiol com cromatografia HPLF-Flu, obtendo bons resultados. Entretanto, decidiu-se adotar o método utilizado por Bila (2005) pois a eluição final do analito era realizada com etanol absoluto, enquanto que Pereira (2011) realizava a eluição com acetonitrila. Como o solvente mais utilizado no teste YES é o etanol, optou-se pelo método de Bila (2005), já que a acetonitrila poderia apresentar toxicidade à levedura.

Assim, os resultados obtidos deixam dúvidas quanto à presença de demais compostos na água do poço que pudessem interferir nos resultados. Para melhor esclarecer este problema são necessários estudos adicionais, envolvendo tanto a preparação das amostras, no procedimento de extração em fase sólida, quanto a execução do teste YES e controle das variáveis envolvidas.

5.3.9 Discussão dos resultados obtidos – Valores de EC₅₀, estrogenicidade e efeito da cloração nas amostras

Quanto ao comportamento das amostras em relação à estrogenicidade e aos valores de EC₅₀ e PR obtidos, estes resultados serão discutidos em conjunto, de modo a se obter alguns delineamentos gerais.

Amostras de água do poço com 17 β -estradiol antes e após a cloração

Em todos os ensaios, uma das amostras em que não foi possível calcular este valor, devido ao grande distanciamento da curva obtida com a situação ideal, foi a de água com 17 β -estradiol. Este problema impossibilitou efetuar a comparação direta entre as amostras antes e

após a cloração, o que prejudicou a análise dos efeitos da cloração na oxidação do 17 β -estradiol.

Neste caso, uma das discussões que podem ser levantadas é em relação ao efeito da cloração na oxidação de compostos que estavam provocando a toxicidade nas amostras mais concentradas. Observou-se que, após a cloração, houve uma redução significativa na toxicidade das amostras, o que pode ser observado pela curva dose-resposta do teste YES, que, em todos os ensaios, ficou próxima ao esperado. Destaca-se neste caso, a curva dose-resposta obtida para a amostra extraída de água com 17 β -estradiol após a cloração obtida no Ensaio 1. Deste modo, poderia-se supor que a cloração contribuiu para a oxidação das substâncias que causavam a toxicidade e a estrogenicidade das amostras.

Entretanto, não há evidências na literatura para suportar esta hipótese da redução da toxicidade devido à cloração. Em geral, o que se observa com a cloração, é formação de subprodutos que podem continuar a apresentar atividade estrogênica, ainda que pouco seja conhecido sobre isto (ALUM et al, 2004; WESTERHOFF et al, 2005).

Ainda, existem poucos estudos relacionando subprodutos da cloração com a presença de toxicidade ou efeitos antagonistas no teste YES. Schilirò et al (2009) utilizaram o teste MicrotoxTM para relacionar a presença de estrogenicidade à toxicidade em amostras de efluente de ETE e do corpo receptor deste efluente, em eventos distintos onde o efluente foi descartado com e sem cloração. Foi observada a detecção de toxicidade quando o efluente foi clorado, enquanto que na ausência da cloração não houve toxicidade. Nenhuma correlação foi encontrada entre a identificação de estrogenicidade à toxicidade, mas houve correlação estatística entre a toxicidade e a presença de trihalometanos, subprodutos da cloração. Estes resultados são difíceis de ser relacionados ao presente estudo, já que tratam-se de matrizes bastante distintas, e a toxicidade neste trabalho foi observada antes da cloração.

Poucos estudos são encontrados para água, entre eles o de Marabini et al (2006), que avaliaram a citotoxicidade de água superficial antes e após o tratamento físico-químico em escala piloto, utilizando ensaio *in vitro* com células humanas (HepG2). Foi observada uma variação sazonal da toxicidade, que foi identificada não só nas amostras cloradas, mas também antes da cloração. Os autores destacam que na análise de águas superficiais a toxicidade pode estar intrínseca à matriz, e não necessariamente ligada à processos de

desinfecção. Por sua vez, a toxicidade após a desinfecção pode se dar tanto pela presença de subprodutos da desinfecção quanto pelo residual dos desinfetantes (MARABINI et al, 2006).

Ainda que no estudo de Marabini et al (2006) tenha sido observado toxicidade nos extratos da água superficial estudada, é precipitado correlacionar estes resultados à toxicidade observada neste estudo, já que tratam-se de situações bastante distintas.

Para estudos futuros, destaca-se que o estudo da toxicidade das amostras à levedura, bem como a adoção de um método de monitoramento do desenvolvimento da levedura no teste YES (como o controle do crescimento pela absorbância 620 nm adotado e apresentado por Frische et al, 2009), é uma importante ferramenta no entendimento completo da resposta do teste YES aos compostos presentes nas amostras e à correta interpretação de seus resultados.

Pode-se ainda apontar que a adição do 17 β -estradiol à água do poço pode ter sido a fonte de toxicidade, já que esta não foi observada para as amostras de água do poço extraídas. Esta hipótese é provável, mas sugere que existe alguma impureza ou problema em um dos reagentes utilizados na solução estoque de 17 β -estradiol. Esta solução foi preparada em etanol absoluto (Sigma-Aldrich®) utilizando o padrão analítico de 17 β -estradiol (>99,9%, Sigma-Aldrich®). Esta hipótese é pouco provável, devido à qualidade e pureza dos reagentes utilizados, mas deve ser explorada em estudos futuros.

Amostras de água do poço

Em relação às demais amostras, apesar deste comportamento de redução de estrogenicidade relatado na literatura não ter sido observado com maior clareza nas amostras de água do poço reforçadas com 17 β -estradiol e com suporte nas curvas dose-resposta do teste YES, este comportamento pôde ser observado nas amostras de água do poço (branco).

No caso dos extratos das amostras de branco, ou seja, água do poço antes e após a cloração, observou-se em todos os ensaios que houve uma clara redução na estrogenicidade após a cloração. Em todos os ensaios, o valor de EC₅₀ aumentou, o que significa que ocorreu

uma redução da estrogenicidade observada nas amostras extraídas. Assim, neste caso, é claramente observado o efeito positivo da cloração na redução da estrogenicidade observada na amostra estudada. A redução da estrogenicidade devido à cloração é relatada em diversos estudos, entre eles o de Alum et al (2004) e Schilirò et al (2009).

Alum et al (2004) utilizaram o teste E-Screen, com células MCF-7 na avaliação da estrogenicidade devido ao 17β -estradiol, Bisfenol A e 17α -etinilestradiol em água após a cloração, estudando concentrações de cloro de 0,25 a 2,0 mgL⁻¹ e tempo de contato entre 1 e 24 horas. Em todas as condições estudadas houve redução da estrogenicidade nas amostras cloradas, e sempre houve estrogenicidade residual, o que foi associado à formação de subprodutos da cloração. Durante a oxidação do 17β -estradiol, na primeira hora observou-se como resposta no bioensaio um baixo nível de estrogenicidade, e um declínio estável da estrogenicidade nas 24 horas seguintes. Isto sugeriu uma estável e lenta transformação das substâncias estudadas em subprodutos capazes de provocar atividade estrogênica.

A identificação de estrogenicidade nestas amostras de água do poço, no entanto, não era esperada. Pereira (2011), em análise da mesma matriz com HPLC-Flu, isentou a água do poço da presença de 17β -estradiol. A presença de outros compostos na água que causam atividade estrogênica é pouco provável, já que não são relatadas fontes de contaminação na região deste poço. O único dos ensaios em que as amostras de água do poço antes e após a cloração não provocaram atividade estrogênica quantificável foi no ensaio 2, mas não foi possível propor hipóteses em relação a esta diferença observada, devido à discrepância dos resultados deste ensaio com os demais.

Assim, observar a presença de estrogenicidade na matriz estudada é um resultado improvável, e que necessita de análises complementares para ser melhor compreendido, tanto no levantamento das causas da presença da atividade estrogênica nesta matriz quanto na identificação das razões destes resultados obtidos.

Poucos estudos relatam atividade estrogênica em água, e destes a maioria é em água superficial, como é o caso de Schilirò et al (2009), que identificaram atividade estrogênica em amostras de água superficial, coletadas de um rio com descarga de efluentes de ETE. Resultados semelhantes com amostras ambientais foram observados por Pawlowski et al (2003) e Beck et al (2006).

A presença de estrogênios em água subterrânea foi identificada por alguns autores, como Hohenblum et al (2004) e Kuster et al (2010), mas em todos estes estudos a fonte de água subterrânea analisada sofria a influência de uma fonte de contaminação. No caso do estudo de Kuster et al (2010), os aquíferos estudados na Suécia e Dinamarca tinham áreas de recarga artificial, realizada com fonte de água superficial, e ambos estavam suscetíveis a contaminação por micropoluentes orgânicos. Hohenblum et al (2004) identificaram a presença de 17 β -estradiol em 20% das amostras de água subterrânea analisadas em concentrações muito baixas, em média de 0,13 ngL⁻¹. Nestas amostras, associaram-se os resultados sempre à presença de aglomerados urbanos ou industriais na região.

Algumas hipóteses podem ser propostas para esclarecer estes resultados. A primeira é a possibilidade de contaminação durante a realização dos ensaios e preparo das amostras. Apesar de terem sido tomados os devidos cuidados com a vidraria e demais materiais utilizados, esta hipótese não pode ser descartada. Entretanto, devido aos cuidados tomados na limpeza de todos os materiais envolvidos, é improvável que a estrogenicidade (bem como os efeitos de toxicidade) observada seja decorrente somente de alguma contaminação presente nos materiais utilizados nos ensaios. Entretanto, para verificar esta hipótese, estudos adicionais devem ser realizados.

Para eliminar esta possibilidade, sugere-se que em estudos futuros seja adotado um procedimento de limpeza das vidrarias utilizadas mais rígido. Como exemplo, aponta-se o adotado por Westerhoff et al (2005), que enxaguava a vidraria com acetona, hexano e metanol, 3 vezes com cada solvente. Hohenblum et al (2004) realizou a limpeza da vidraria com acetona e água, seguido por um período de secagem a 110°C. Em seguida, a vidraria ainda era limpa com isooctano.

Outro ponto que deve ser abordado é a fase de preparação das amostras pela extração em fase sólida. Especificamente nesta fase são necessários estudos adicionais, como a implementação de uma amostra controle, por exemplo constituída de água ultrapura submetida ao processo de extração. Com esta medida, seria possível identificar se ocorre alguma contaminação constante da amostra, decorrente do processo de extração. Este controle foi adotado por alguns autores como controle do processo, como Pawlowski et al (2004), e pode auxiliar na identificação dos desvios dos resultados obtidos com a água do poço extraída.

Apesar dos problemas apresentados na resposta do teste YES, os valores de EC_{50} serão aqui utilizados como uma forma indicativa dos resultados obtidos com a cloração e como uma forma de utilizar o teste YES para comparar as amostras estudadas. Nas amostras em que foi possível observar os efeitos da cloração, por sua vez, observou-se que esta teve um efeito positivo na redução da atividade estrogênica observada com o teste YES, o que indica a potencialidade do uso da etapa da cloração com a finalidade de remoção da atividade estrogênica nos processos de tratamento de água.

É necessário destacar, entretanto, que existem incertezas nos resultados aqui apresentados e são necessários estudos adicionais para confirmar as hipóteses aqui apresentadas.

6. CONCLUSÕES

Na execução deste trabalho, foram encontrados muitos problemas relativos à implementação e execução do teste YES. O principal problema foram as amostras de branco (controle negativo – etanol) contaminadas, com uma alteração de coloração muito intensa antes do fim do período de incubação. Estes problemas tiveram uma grande interferência negativa no teste YES, e por isso foi necessário realizar esta etapa do trabalho no LES, na UERJ, onde o teste tem sido executado com sucesso.

Como um bioensaio *in vitro*, o teste YES deve atender a alguns requisitos para que as curvas dose-resposta das amostras possam ser comparadas com confiabilidade com a curva padrão. Entretanto, algumas destas condições não foram completamente atendidas no desenvolvimento deste trabalho, como é o caso do paralelismo que deve existir entre as curvas dose-resposta e a curva padrão. Ainda, algumas amostras causaram um efeito negativo, associado à toxicidade, no desenvolvimento da levedura durante o teste, o que prejudicou as curvas dose-resposta.

Assim, algumas questões relativas à implementação do teste YES foram levantadas. Entre elas, o grande cuidado que deve existir na escolha dos reagentes e no preparo dos meios utilizados, já que o teste apresenta alta sensibilidade, quaisquer fontes de contaminação podem afetá-lo negativamente.

Ainda, outros fatores podem afetar o desenvolvimento do teste (BERESFORD et al, 2000), como é o caso do tempo de incubação, observado neste estudo. Por isso, um rígido controle destes fatores deve ser realizado, de modo a evitar quaisquer interferências que possam ter resultados negativos no teste, como por exemplo, reduzindo sua sensibilidade (resultando em maiores valores de EC_{50}).

Durante a análise dos dados do teste YES para os ensaios de cloração, o principal problema enfrentado foi a impossibilidade de calcular o valor de EC_{50} para todas as amostras dos ensaios. Este problema ocorreu em todas as amostras extraídas de água com 17-estradiol, o que impossibilitou a comparação entre o antes e depois da cloração. Com isso, especificamente nestas amostras não pode se traçar um delineamento geral da influência da cloração na estrogenicidade, já que não foi possível calcular estes valores devido à grande

distância entre a resposta obtida e a situação esperada. Para o cálculo do EC₅₀ com confiabilidade as curvas teriam que ter uma faixa de resposta semelhante à curva padrão, e não poderiam ter ocorrido tantas interferências na curva, como as observadas devido aos efeitos de toxicidade destas amostras na levedura.

Por sua vez, as amostras de água do poço extraídas antes e após a cloração, geraram curvas dose-resposta satisfatórias para o teste YES, ainda que algumas condições não tenham sido completamente atendidas. É possível observar que a cloração causou um efeito positivo nestas amostras. Observou-se redução da toxicidade nas amostras de água com 17 β -estradiol após a cloração, o que poderia ser um indicativo de que a oxidação com cloro teve um efeito positivo nas substâncias que estariam provocando a toxicidade observada nestas amostras. Entretanto, não se encontrou suporte na literatura à esta hipótese, e por esta razão, estudos adicionais devem ser realizados para sustentá-la.

Assim, pode-se inferir que o teste YES mostra-se como um importante aliado para a identificação e quantificação da estrogenicidade no tratamento de água. Entretanto, esta afirmação só é válida se forem monitorados os fatores que influenciam na resposta do teste, e eventuais interferências, como alterações no desenvolvimento da levedura forem monitoradas e entendidas. Desta maneira, mostra-se a necessidade de integrar o teste YES com técnicas analíticas complementares, que possibilitem uma maior compreensão das substâncias presentes na matriz estudada que são responsáveis pela atividade estrogênica. Por ser um teste *in vitro*, é importante lembrar que seus resultados não podem ser extrapolados sem análises complementares, tanto químicas quanto bioensaios *in vivo*.

Da mesma maneira, a cloração mostra-se um processo de tratamento promissor para a redução da estrogenicidade devida ao 17 β -estradiol em água de abastecimento, devido ao seu potencial para oxidar as substâncias desreguladoras endócrinas. Neste trabalho, observou-se em uma das situações estudadas a redução da atividade estrogênica ocasionada pela cloração.

7. SUGESTÕES

Como sugestões para trabalhos futuros apresentam-se:

- A realização do teste YES em conjunto com técnicas analíticas, para identificação dos compostos responsáveis pela atividade estrogênica;
- A adoção do controle do crescimento da levedura nas amostras pelo cálculo da toxicidade como complemento ao teste YES;
- A adoção de procedimentos de limpeza de vidraria mais rigorosos, de maneira a evitar quaisquer contaminações;
- A realização de estudos comparativos entre técnicas de extração em fase sólida, de maneira a selecionar o procedimento mais adequado para a matriz estudada (água do poço);
- A realização de ensaios *in vivo* em conjunto com o teste YES, de forma a se obter uma maior compreensão dos resultados obtidos com o teste em organismos mais complexos e de como estes resultados se relacionam.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDA, M. J. L.; BARCELO, D. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-diode array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 911, n. 2, p. 203-210, 2001.

ALEXANDER, B. et al. A simple and accurate mathematical method for calculation of the EC₅₀. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 41, n. 2-3, p. 55-58, 1999.

ALUM, A. et al. Oxidation of bisphenol A, 17 beta-estradiol, and 17 alpha-ethynyl estradiol and byproduct estrogenicity. **Environmental Toxicology**, v. 19, n. 3, p. 257-264, 2004.

ANDERSEN, H. R. et al. Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, p. 89-108, 1999.

APHA; AWWA; WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington, DC: WEF: 1368 p p. 2005.

AWWA **Removal of EDCs and pharmaceuticals in drinking and reuse treatment processes**. Washington, DC, 2007.

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, n. 11, p. 1870-1878, 2006.

BERESFORD, N. et al. Issues arising when interpreting results from an in vitro assay for estrogenic activity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 162, n. 1, p. 22-33, 2000.

BILA, D. M. Degradação remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17β-estradiol pelo processo de ozonização. 2005. 281 (Doutorado em Ciências em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, 2005.

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. et al. Yeast Estrogen Screen Assay as a Tool for Detecting Estrogenic Activity in Water Bodies. **Food Technology and Biotechnology**, v. 50, n. 4, p. 427-433, 2012.

BRIX, R. et al. Evaluation of the suitability of recombinant yeast-based estrogenicity assays as a pre-screening tool in environmental samples. **Environment International**, v. 36, n. 4, p. 361-367, 2010.

CHANG, P. C. Condition of similarity and the existence of constant relative potencies. **Mathematical Biosciences**, v. 23, n. 1-2, p. 25-31, 1975.

CHEN, C.-Y. et al. Determining estrogenic steroids in Taipei waters and removal in drinking water treatment using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Science of the Total Environment**, v. 378, n. 3, p. 352-365, 2007.

CITULSKI, J.; FARAHBAKHS, K. Overcoming the toxicity effects of municipal wastewater sludge and biosolid extracts in the Yeast Estrogen Screen (YES) assay. **Chemosphere**, v. 87, n. 5, p. 498-503, 2012.

EUROPEAN COMMISSION. **Community Strategy for Endocrine Disrupters - a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife**. Brussels, Belgium. 1999.

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, SP**. 2009. Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP.

DE BOEVER, P. et al. Optimization of a yeast estrogen screen and its applicability to study the release of estrogenic isoflavones from a soygerm powder. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 7, p. 691-697, 2001.

DE LEAN, A.; MUNSON, P. J.; RODBARD, D. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. **American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism and Gastrointestinal Physiology**, v. 4, n. 2, p. E97-E102, 1978.

DEBORDE, M.; VON GUNTEN, U. Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment - Kinetics and mechanisms: A critical review. **Water Research**, v. 42, n. 1-2, p. 13-51, 2008.

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

FOLMAR, L. C. et al. A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor in vivo and in vitro. **Aquatic Toxicology**, v. 60, n. 1-2, p. 101-110, 2002.

FRISCHE, T. et al. Toxic masking and synergistic modulation of the estrogenic activity of chemical mixtures in a yeast estrogen screen (YES). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 16, n. 5, p. 593-603, 2009.

GAIDO, K. W. 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, n. 1, p. 205-212, 1997.

GEROLIN, E. R. R. **Ocorrência e remoção de disruptores endócrinos em águas utilizadas para abastecimento público de Campinas e Sumaré - SP**. 2008. 190 p. Tese (Doutorado) . Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Universidade Estadual de Campinas., CAMPINAS, SP.

GOMES, R. L. et al. Simultaneous determination of natural and synthetic steroid estrogens and their conjugates in aqueous matrices by liquid chromatography/mass spectrometry. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 85, n. 1, p. 1-14, 2005.

HAMBLIN, E. L.; CRONIN, M. T. D.; SCHULTZ, T. W. Estrogenicity and acute toxicity of selected anilines using a recombinant yeast assay. **Chemosphere**, v. 52, n. 7, p. 1173-1181, 2003.

HOHENBLUM, P. et al. Monitoring of selected estrogenic hormones and industrial chemicals in groundwaters and surface waters in Austria. **Science of the Total Environment**, v. 333, n. 1-3, p. 185-193, 2004.

HU, J. Y. et al. Products of aqueous chlorination of 17 beta-estradiol and their estrogenic activities. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 24, p. 5665-5670, 2003.

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

KUSTER, M. et al. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). **Environment International**, v. 35, n. 7, p. 997-1003, 2009.

_____. Fate of selected pesticides, estrogens, progestogens and volatile organic compounds during artificial aquifer recharge using surface waters. **Chemosphere**, v. 79, n. 8, p. 880-886, 2010.

LEE, B. C. et al. Effects of chlorine on the decrease of estrogenic chemicals. **Water Research**, v. 38, n. 3, p. 733-739, 2004.

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, n. 2, p. 731-748, 2009.

MARABINI, L. et al. Toxicity evaluation of surface water treated with different disinfectants in HepG2 cells. **Water Research**, v. 40, n. 2, p. 267-272, 2006.

PAWLOWSKI, S. et al. Combined in situ and in vitro assessment of the estrogenic activity of sewage and surface water samples. **Toxicological Sciences**, v. 75, n. 1, p. 57-65, 2003.

PEREIRA, R. D. O. **Formação de subprodutos do estrona e 17 β -estradiol na oxidação utilizando cloro e o ozônio em água**. 2011. 192 p. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

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

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.

SCHILIRO, T. et al. The endocrine disrupting activity of surface waters and of wastewater treatment plant effluents in relation to chlorination. **Chemosphere**, v. 75, n. 3, p. 335-340, 2009.

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

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

SOLE, M. et al. Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the Catalanian area (NE Spain). **Environmental Science & Technology**, v. 34, n. 24, p. 5076-5083, 2000.

SWART, J. C.; POOL, E. J.; VAN WYK, J. H. The implementation of a battery of in vivo and in vitro bioassays to assess river water for estrogenic endocrine disrupting chemicals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 1, p. 138-143, 2011.

TERNES, T. A. et al. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil (vol 225, pg 81, 1999). **Science of the Total Environment**, v. 228, n. 1, p. 87-87, 1999.

USEPA. **Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis**. . Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, 1997.

_____. **EPA's Endocrine Disruptor Screening Program Should Establish Management Controls to Ensure More Timely Results**. Washington, DC. 2011

VANDERPERREN, E. et al. Oestrogenic activity of CPRG (chlorophenol red-beta-D-galactopyranoside), a beta-galactosidase substrate commonly used in recombinant yeast oestrogenic assays. **Biomarkers**, v. 6, n. 5, p. 375-380, 2001.

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.

WESTERHOFF, P. et al. Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 17, p. 6649-6663, 2005.

YING, G. G. et al. Occurrence and implications of estrogens and xenoestrogens in sewage effluents and receiving waters from South East Queensland. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 18, p. 5147-5155, 2009.