**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

ANA MARCELA DI DEA BERGAMASCO

**Emprego de bioensaios para avaliação da atividade
estrogênica em água para consumo humano
e mananciais do Estado de São Paulo**

São Paulo
2010

ANA MARCELA DI DEA BERGAMASCO

**Emprego de bioensaios para avaliação da atividade
estrogênica em água para consumo humano
e mananciais do Estado de São Paulo**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do
Título de Mestre em Toxicologia

Área de Concentração: Toxicologia Ambiental

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gisela de Aragão Umbuzeiro

São Paulo

2010

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

Di Dea Bergamasco, Ana Marcela

Emprego de bioensaios para avaliação da atividade estrogênica em água para consumo humano e mananciais do Estado de São Paulo / Ana Marcela Di Dea Bergamasco ; Orientador: Gisela Aragão Umbuzeiro. – São Paulo, 2010.

120 f. : fig.

Dissertação de Mestrado. Área de Concentração: (Toxicologia Ambiental). -- Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

1. Interferentes endócrinos 2. Estrogênio 3. Água 4. Mananciais 5. Bioensaios 6. *Saccharomyces cerevisiae* 7. Bioluminescência 8. Água bruta 9. Água tratada 10. Monitoramento de água.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Marcela Di Dea Bergamasco

Emprego de bioensaios para avaliação da atividade estrogênica em água para consumo humano e mananciais do Estado de São Paulo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do
Título de Mestre em Toxicologia
Área de Concentração: Toxicologia Ambiental

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Intituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Intituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Intituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*Aos meus pais,
por tudo que fizeram por mim.
Pelo amor incondicional, por sempre se preocuparem,
ajudarem, me guiando mesmo nos momentos mais difíceis*

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pelo dom da vida.

Ao meu pai, Antoninho, que sempre alimentou meus sonhos sem, jamais, medir esforços na realização dos mesmos, e que sempre estará ao meu lado dando força.

À minha mãe, Assunta, referência de vida, que sempre se esforçou para me fornecer a melhor educação e deu o melhor de si fazendo o possível e o impossível.

À minha Irmã, Maria Daniela, pelo constante apoio e por me ajudar e me ouvir nos momentos mais difíceis.

À Anne Lise por todo equilíbrio, apoio, dedicação e por acreditar no meu desenvolvimento.

À minha orientadora, Dra. Gisela, pelo conhecimento compartilhado, pela competência e por todo empenho me auxiliar e ajudar a desenvolver e aprofundar meus conhecimentos. Agradeço, sobretudo, pela amizade e compreensão, pelo jeito carinhoso de ensinar, pelo profissionalismo e competência inquestionáveis.

À Dra. Silvia Berlanga, por todo apoio e todas as informações fornecidas, de suma importância para o desenvolvimento deste trabalho.

À Melanie di Claudio e Daniela França pelo constante apoio, carinho e disposição em ajudar. Pelos ensinamentos e auxílios que sempre deram, e que foram essenciais para este trabalho.

Aos amigos da CETESB – São Paulo: Célia, Gilson, Simone, Wallace, Daniela França, Pedro, Adauton, Flávia, pelo companheirismo, apoio e boa vontade em ajudar.

À equipe do Laboratório de Química Ambiental da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), especialmente à Fernando Sodr, Cassiana e Dr Wilson

Figueiredo Jardim por todo o trabalho realizado e pela oportunidade que tive de participar.

Aos secretários da Pós-Graduação, Jorge e Elaine, pela competência, profissionalismo.

Ao CNPq pelo apoio financeiro ao Projeto de Mestrado.

À FAPESP pelo financiamento ao projeto temático “Ocorrência e Atividade Estrogênica de Interferentes Endócrinos em Água para Consumo Humano e em Mananciais do Estado de São Paulo”.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“A possibilidade de arriscar
é que nos faz homens
Vôo perfeito no espaço
que criamos
ninguém decide sobre os passos
que evitamos
Certeza de que não somos pássaros
E que voamos
Tristeza de que não vamos
Por medo dos caminhos” (Damário daCruz)*

*“Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende.”
(Guimarães Rosa)*

RESUMO

BERGAMASCO, A M. D. D. **Emprego de bioensaios para avaliação da atividade estrogênica em água para consumo humano e mananciais do Estado da São Paulo.** Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Interferentes endócrinos (IE) são substâncias capazes de afetar o sistema endócrino causando danos à saúde. Os compostos estrogênicos são um tipo de IE que geram resposta biológica semelhante aos hormônios endógenos, chamada atividade estrogênica, são frequentemente encontrados no ambiente devido à poluição de origem antrópica e ineficiência de processos de tratamento de água e esgoto. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade estrogênica de águas de mananciais e águas tratadas para abastecimento no Estado de São Paulo por meio de bioensaios. Foram utilizados dois métodos, baseados em diferentes linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* capazes de responder a agentes estrogênicos pela presença do gene que codifica para o receptor de estrogênio humano e sistemas de gene repórter da atividade estrogênica. Uma das linhagens contém o gene *luc*, método denominado neste trabalho de Lesk, enquanto a outra contém genes *lux* como repórter, denominado método San. Os métodos foram comparados quanto à especificidade e sensibilidade de resposta aos principais interferentes endócrinos de ocorrência em águas e com dados de análises cromatográficas das respectivas amostras ambientais. Foi observada atividade estrogênica expressiva nas águas brutas coletadas em pontos específicos nas cidades de Campinas, Barueri, Cerquilha e em efluente hospitalar e em todas essas amostras foram detectados compostos estrogênicos-alvo. As amostras de água tratada não apresentaram atividade estrogênica nem compostos estrogênicos, com apenas uma exceção. O método San foi mais sensível que o método Lesk, tanto para compostos químicos puros quanto para amostras ambientais. O teor de substâncias detectado por análises cromatográficas não foi suficiente para explicar a atividade estrogênica observada nos bioensaios, indicando que concentrações abaixo dos limites de detecção podem gerar o efeito biológico ou que compostos estrogênicos não estudados e suas misturas podem estar presentes gerando efeitos aumentados.

Palavras-chave: interferentes endócrinos, estrogênio, água, mananciais, bioensaios, *Saccharomyces cerevisiae*, bioluminescência, água bruta, água tratada, monitoramento de água.

ABSTRACT

BERGAMASCO, A. M. D. D. **Use of bioassays for assessing estrogenic activity of water for human consumption and raw water from State of Sao Paulo** Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Endocrine disrupting (ED) chemicals are compounds able to interact with the endocrine system causing health adverse effects. Estrogenic compounds are a type of ED that produce a biological response similar to organism's natural hormones, called estrogenic activity; they are frequently found in the environment and are usually associated to the pollution from human activities. The goal of this work was to evaluate the estrogenic activity of rivers raw and treated water around the State of São Paulo – Brazil - using bioassays. Two different strains of *Saccharomyces cerevisiae* able to respond to estrogenic compounds, due to the presence of genes that encodes for the human estrogen receptor, were used. One of the strains has the *luc* gene (method Lesk), a reporter of estrogenic activity and the other contains *lux* genes (method San) as reporter of estrogenic activity. Both methods were compared regarding their specificity and sensitivity for chemical substances and environmental samples. The results were also compared with the chemical analysis data of target pure compounds in those waters and with the literature. Estrogenic activity was detected in raw water samples collected in Campinas, Barueri and Cerquillo and also in hospital effluent, for all those samples estrogenic compounds were determined. San method showed to be more sensitive to pure chemical compounds and environmental samples. For treated water no estrogenic activity was found, except for one sample from Barueri that presented a low response. The amounts of compounds detected by chromatographic analysis were not sufficient to explain the observed estrogenic activity when bioassays were used, therefore low compounds concentration or other compounds and their mixtures may be responsible for the high biological effect detected by bioassays.

Keywords: endocrine disrupting chemicals, estrogen, water, bioassays, *Saccharomyces cerevisiae*, bioluminescence, water monitoring, raw water, drinking water

Lista de figuras

Figura 1. Representação esquemática dos possíveis processos e compartimentos ambientais envolvidos no destino de compostos estrogênicos no ambiente	23
Figura 2. Representação esquemática da linhagem <i>S. cerevisiae</i> contendo o receptor de estrógeno humano ER α , elementos de resposta a estrógeno (ERE) e o gene <i>luc</i> . Compostos estrogênicos atravessam a membrana da célula e se ligam ao receptor de estrógeno. Este complexo interage com ERE, iniciando a transcrição do gene <i>luc</i>	36
Figura 3. Representação esquemática da linhagem <i>S. cerevisiae</i> contendo o receptor de estrógeno humano hER, elementos de resposta a estrógeno (ERE) e genes <i>lux -A</i> , <i>-B</i> , <i>-C</i> , <i>-D</i> , e <i>-E</i> , empregados no método San. Compostos estrogênicos atravessam a membrana da célula e se ligam ao receptor de estrógeno. Este complexo interage com EREs, iniciando a transcrição de <i>lux A</i> e <i>lux B</i>	38
Figura 4. Localização dos pontos amostrais para águas brutas e tratadas	58
Figura 5. Ilustração dos procedimentos empregados no método Lesk.....	65
Figura 6. Ilustração esquemática dos procedimentos e etapas empregados para realização do bioensaio de acordo com o método San.	70
Figura 7. Ilustração das etapas seguidas na tomada de decisão para determinar se compostos ou amostras ambientais são estrogênicos; tóxicos; estrogênicos e tóxicos, ou ainda, não estrogênicos e não tóxicos.	72
Figura 8. Curva dose-resposta para o composto E2 em termos de porcentagem da resposta máxima em diferentes concentrações de composto testado pelo método Lesk.	77
Figura 9. Curva dose-resposta para o composto E2 em termos de porcentagem da resposta máxima em diferentes concentrações de composto testado pelo método San.	77
Figura 10. Curvas de resposta para ensaio através do método Lesk para as substâncias puras E2, EE2, E1, DES e E3. Os resultados são expressos em termos da resposta máxima de E2 versus log da concentração molar dos compostos.	79
Figura 11. Curvas de resposta para ensaio através do método San para as substâncias puras E2, EE2, E1, DES e E3. Os resultados são expressos em termos da resposta máxima de E2 versus log da concentração molar dos compostos.	80

Figura 12. Curvas dose-resposta em termos de porcentagem da resposta máxima obtida para E2 versus o log dos fatores de concentração dos extratos de amostra com emprego do método Lesk e San para amostras de águas tratadas de Campinas, coletadas em abril (Lesk-abril e San-abril) e junho (Lesk-junho e San-junho) de 2009..... 84

Figura 13. Curvas dose-resposta em termos de porcentagem da resposta máxima obtida para E2 versus o log dos fatores de concentração do extrato de amostra com emprego do método Lesk e San para amostra de água bruta do ponto Campinas coletada em junho de 2009. 85

Figura 14. Curvas dose-resposta em termos de porcentagem da resposta máxima obtida para E2 versus o log dos fatores de concentração dos extratos de amostra com emprego do método Lesk e San para amostras de águas tratadas coletadas em abril (Lesk-abril e San-abril) e junho (Lesk-junho e San-junho) de 2009 em Atibaia. 87

Figura 15. Curvas dose-resposta em termos de porcentagem da resposta máxima obtida para E2 versus o log dos fatores de concentração do extrato de amostra com emprego do método Lesk e San para amostra de água bruta no ponto Atibaia, coletada em junho de 2009. 88

Figura 16. Curvas dose-resposta em termos de porcentagem da resposta máxima obtida para E2 versus o log dos fatores de concentração dos extratos de amostra com emprego do método Lesk e San para amostras de águas tratadas coletadas em abril (Lesk-abril e San-abril) e junho (Lesk-junho e San-junho) de 2009, em Guarulhos..... 89

Figura 17. Curvas dose-resposta em termos de porcentagem da resposta máxima obtida para E2 versus o log dos fatores de concentração do extrato de amostra com emprego do método Lesk e San para amostra de água bruta no ponto Guarulhos, coletada em junho de 2009. 90

Figura 18. Curvas dose-resposta em termos de porcentagem da resposta máxima obtida para E2 versus o log dos fatores de concentração dos extratos de amostra com emprego do método Lesk e San para amostras de águas tratadas de Barueri, coletadas em abril (Lesk-abril e San-abril) e junho (Lesk-junho e San-junho) de 2009..... 91

Figura 19. Curvas dose-resposta em termos de porcentagem da resposta máxima obtida para E2 versus o log dos fatores de concentração do extrato de amostra com emprego do método Lesk e San para amostra de água bruta no ponto Barueri coletada em junho de 2009. 92

Figura 20. Curvas dose-resposta em termos de porcentagem da resposta máxima obtida para E2 versus o log dos fatores de concentração dos extratos de amostra com emprego do método Lesk e San para amostras de águas tratadas coletadas em abril (Lesk-abril e San-abril) e junho (Lesk-junho e San-junho) de 2009 em Cerquilha..... 93

Figura 21. Curvas dose-resposta em termos de porcentagem da resposta máxima obtida para E2 versus o log dos fatores de concentração do extrato de amostra com emprego do método Lesk e San para amostra de água bruta no ponto Cerquilha, coletada em junho de 2009. 94

Figura 22. Curvas dose-resposta em termos de porcentagem da resposta máxima obtida para E2 versus o log dos fatores de concentração dos extratos de amostra com emprego do método Lesk e San para efluente hospitalar coletado em junho de 2009..... 96

Figura 23. Valores máximos de atividade estrogênica em equivalentes de E2 através de bioensaios com leveduras recombinantes para águas superficiais de diversos países e nessa pesquisa. (1) CÉSPEDES et al.; 2005; (2) VERMEIRSEN et al.; 2005; (3) MA et al.; 2007; (4) CÉSPEDES et al.; 2004; (5) FAWELL et a.; 2001; (6) PAWLOWSKI et al.; 2003; (7) MURK et al.; 2002. 100

Lista de tabelas

Tabela 1. Ensaios <i>in vitro</i> para avaliação da atividade estrogênica por ativação transcricional de gene repórter mediada por hER de acordo com o tipo de célula empregada, o <i>endpoint</i> (ponto de avaliação) medido, o tipo de gene repórter utilizado e tempo para obtenção de resultados.	40
Tabela 2. Resultados encontrados em trabalhos avaliando a atividade estrogênica em extratos obtidos por SPE (extração em fase sólida) de amostras ambientais através de bioensaio com leveduras recombinantes e detecção de compostos de interesse por análises químicas.	50
Tabela 3. Fórmula do meio de cultura do método	62
Tabela 4. Fórmula do meio de cultura para placas e meio de crescimento	63
Tabela 5. Fórmula de preparo do meio mínimo (YMM).	66
Tabela 6. Fórmula de preparo das soluções de vitaminas para volume final de 500 mL de solução.	67
Tabela 7. Compostos avaliados por análises cromatográficas, com suas respectivas fórmulas, massas molares e abreviações	75
Tabela 8. Valores de CE ₅₀ e potências relativas (TEQ) obtidos nesta pesquisa comparados com dados da literatura	81
Tabela 9. Resultados de análises cromatográficas de compostos-alvo detectados; valores calculados em termos de equivalentes de E2 a partir da potência relativa dos compostos estrogênicos detectados; e atividade estrogênica pelo método San e Lesk em termos de equivalentes de E2, para as amostras de água tratada e bruta, e efluente hospitalar estudados.	97

Lista de abreviaturas e Siglas

ATIB	Código do Rio Atibaia adotado pela CETESB	IET	Índice de Estado Trófico
BLYES	Linhagem responsiva a estrógeno para o método San	IEs	Interferentes Endócrinos
BLYR	Linhagem controle de luminescência para o método San	LD	Limite de detecção
BMA64/Luc	Linhagem responsiva a estrógeno pelo método Lesk	LOAEL	Menor efeito positivo observado
BPA	Bisfenol - A	LQA	Laboratório de Química Ambiental
CAS	Chemicals Abstracts Service	luc	Gene de vagalume responsável pela bioluminescência
CE50	Concentração efetiva que causa 50% do efeito máximo investigado	lux	Gene de bactérias responsável pela bioluminescência
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo	Mix aa	Mistura de aminoácidos utilizada para preparo de meios no método Lesk
COTI	Código do Rio Cotia adotado pela CETESB	MS	Espectrometria de massas
CPS	"counts per second"	NA	Não avaliado
Ctrl Luc	Linhagem controle de Luminescência para o método Lesk	ND	Não detectado
DES	Dietilstilbestrol	nNP	4-n-nonilfenol
DMSO	Dimetilsulfóxido	nOP	4-n-octilfenol
DO	Densidade ótica	PTFE	Teflon – polietrafluoretileno
E1	Estrona	SD	Desvio padrão
E2	17 β -estradiol	SORO	Código do Rio Sorocaba adotado pela CETESB
E3	Estriol	SPE	Extração em fase sólida
EE2	17 α -etinilestradiol	TEQ	"Toxic Equivalent Coefficient", potência relativa
Era	Receptor de estrógeno tipo α	TGDE	Código do reservatório Tanque Grande adotado pela CETESB
Erβ	Receptor de estrógeno tipo β	TOP	Terc-octilfenol
ETA	Estação de tratamento de água	ÚNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
ETE	Estação de Tratamento de Esgotos	YES	"Yeast estrogen screen", bioensaio com leveduras
hER	Receptor de estrogênio humano	YMM	Meio de cultura mínimo para o método San
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência	YMMG	Meio de cultura para crescimento de leveduras utilizado no método San
IAP	índice de qualidade da água bruta para fins de abastecimento público adotado pela CETESB	YNB	Meio de cultura sem aminoácidos para o método Lesk

Sumário

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Tipos e Ação de Compostos Estrogênicos	19
1.2 Compostos Estrogênicos no Ambiente: Fontes, Efeitos e Ocorrência	22
1.3 Métodos para Avaliação de Atividade Estrogênica em Amostras Ambientais	30
1.4 Avaliação de Atividade Estrogênica em Amostras Ambientais Através de Análises Biológicas	40
2 OBJETIVOS.....	53
3 MATERIAL E MÉTODOS	55
3.1 Delineamento Experimental	56
3.2 Caracterização da coleta e dos pontos amostrais	57
3.3 Extração e Pré-concentração das Amostras	60
3.4 Bioensaios	61
3.4.1 Método Lesk	61
3.4.2 Método San	65
3.5 Análise dos Dados	70
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.1 Avaliação de 17 β -estradiol (E2)	76
4.2 Outras Substâncias Avaliadas	78
4.3 Avaliação de Amostras Ambientais	84
5 CONCLUSÕES.....	105
6 REFERÊNCIAS	108
ANEXO.....	119

Contaminantes emergentes ou micropoluentes são substâncias de diferentes classes químicas que apresentam como particularidade a capacidade de gerar respostas biológicas mesmo quando em baixíssimas concentrações. São exemplos os fármacos, pesticidas, nanomateriais, interferentes endócrinos que recentemente passaram a ser estudados e são continuamente encontrados no meio ambiente (BILA; DEZOTTI, 2007).

Os Interferentes Endócrinos (IE) merecem destaque por serem compostos com comprovada capacidade de gerar efeitos adversos no sistema endócrino de seres humanos e outros organismos. Foram definidos por Kavlock et al. (1996) como *“agentes exógenos que interferem na produção, secreção, transporte, ligação, ação, metabolismo e/ou eliminação de hormônios naturalmente produzidos pelo organismo, e responsáveis por manter a homeostase e regulação de processos de desenvolvimento”* (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2007a).

Segundo documentos do “Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee” (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2007b), os mecanismos através dos quais se dá a ação de um IE são: (1) substâncias que mimetizando a ação de hormônios naturais, levam o metabolismo a gerar resposta ao estímulo hormonal ou a responder de maneira inadequada; (2) bloqueio dos efeitos de certos hormônios naturais em seus receptores; ou (3) estímulo ou inibição, levando à hiper ou hipoprodução de hormônios do sistema endócrino.

Substâncias presentes em produtos como pesticidas, herbicidas, fungicidas, surfactantes, organometais, hidrocarbonetos poliaromáticos halogenados, fitoestrogênios, plastificantes, entre outros podem causar alguns dos efeitos citados ao desempenhar funções de estrogênios, androgênios e hormônios da tireoide. No

entanto, ainda não foram estabelecidas de forma segura as concentrações em que representam risco, bem como ainda permanece controverso na comunidade científica quais são os mais eficientes métodos analíticos para avaliação destes compostos com vistas à saúde humana (COLBORN et al., 1993, 1996; BILA; DEZOTTI, 2007).

Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS/ WHO) e a Agência Ambiental Norte Americana – USEPA sugerem valores máximos toleráveis para mais de 125 contaminantes emergentes em água para consumo humano, muitos dos quais estrogênicos. Outros compostos e poluentes fora desta lista e padrões de qualidade a eles relacionados não são apreciados na legislação ambiental da maioria dos outros países, mas esforços internacionais na elucidação dos riscos que oferecem estão sendo estimulados com o objetivo de regulamentar essas substâncias (SCHRIKS et al., 2010).

O presente trabalho faz parte do projeto temático intitulado “Ocorrência e Atividade Estrogênica de Interferentes Endócrinos em Água para Consumo Humano e em Mananciais do Estado de São Paulo” (FAPESP), coordenado por Dr Wilson de Figueiredo Jardim e Dra Gisela de Aragão Umbuzeiro da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), cujo objetivo é ampliar os conhecimentos acerca da presença de interferentes endócrinos no Brasil. Nos tópicos subsequentes será apresentada revisão de documentos e pesquisas acerca dos tipos de compostos estrogênicos, presença no meio ambiente, efeitos já observados, bem como os principais métodos e resultados já publicados referentes à sua análise que subsidiaram a escolha e avaliação dos métodos ora aplicados.

1.1 Tipos e Ação de Compostos Estrogênicos

Além da grande variedade estrutural, IE exibem propriedades físico-químicas distintas, sendo que alguns são persistentes e lipofílicos, enquanto outros são hidrofílicos e mais facilmente degradados. Tais características determinam as vias de exposição, toxicocinética, toxicodinâmica e maior ou menor facilidade de sua remoção por tratamento convencional de água (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Para medidas de pesquisa, os interferentes endócrinos estrogênicos são classificados nas quatro classes listadas a seguir, conforme sua origem e estrutura (GUTENDORF; WESTENDORF, 2001):

(1) Fitoestrogênios: são substâncias naturais presentes em plantas. Podem atuar ocupando receptores estrogênicos, já que contêm em sua estrutura química um anel fenólico aromatizado com o grupo oxidrila, o qual é responsável pela ligação com o receptor de estrógeno. As isoflavonas presentes na soja são as mais conhecidas e são utilizadas em medicamentos, principalmente em terapias de reposição hormonal. No geral, os fitoestrogênios apresentam baixa atividade estrogênica no homem, com menor capacidade de causar danos ao sistema endócrino se presentes em baixas concentrações (GUTENDORF; WESTENDORF, 2001).

(2) Xenoestrogênios: são compostos não produzidos pelos organismos (exógenos), geralmente sintéticos não esteróides e possuem habilidade de mimetizar (agonistas) ou bloquear (antagonistas) a atividade dos hormônios endógenos, bem como alterar a forma de atuação, produção e metabolização dos hormônios e dos respectivos receptores. A excreção destes compostos,

normalmente, é mais difícil do que dos não xenobióticos. São, no geral, hidrofóbicos e podem se acumular no tecido adiposo, no cérebro, no aparelho reprodutor e em outros órgãos, favorecendo a bioacumulação nos organismos e biomagnificação na cadeia trófica (CUNNINGHAM et al., 1997). Alguns dos compostos desta classe são Bisfenol-A (BPA), Bifenilas Policloradas (PCBs), inseticidas como o DDT (metabólitos DDE e DDD), atrazina, linuron, hexaclorobenzeno, pentaclorofenol entre outros. Solventes clorados e inseticidas são xenoestrogênios que agem no sistema de determinados insetos, outros são subprodutos de processos industriais e atingem as águas superficiais devido a sua incompleta remoção nas estações de tratamento de efluentes (BIRKETT; LESTER, 2003).

(3) Estrogênios Sintéticos: encontrados em produtos farmacêuticos, são esteróides com estruturas moleculares alteradas artificialmente. No geral, são mais potentes do que os estrogênios endógenos (GUTENDORF; WESTENDORF, 2001). O principal composto dessa classe é o 17 α -etinilestradiol (EE2), estrogênio sintético utilizado em pílulas anticoncepcionais, considerado o mais potente entre os compostos estrogênicos e resistente à biodegradação devido à presença do grupo etinileno em sua estrutura, diferentemente do 17 β -estradiol (E2), que apresenta grupo hidroxila ligado ao anel fenólico (CARGOUET et al., 2004). Terapias de reposição hormonal também representam atividades em que se usam os estrogênios sintéticos (SONNENSCHNAIN; SOTO, 1998).

(4) Estrogênios Endógenos: São os responsáveis pelo desenvolvimento das características sexuais femininas primárias e secundárias; pertencem a um grupo de hormônios esteróides lipossolúveis produzidos nos ovários, placenta, e em menor quantidade nos testículos e no córtex adrenal a partir do colesterol. Os principais

representantes desta classe são o estriol (E3), estrona (E1) e 17 β -estradiol (E2) (GUTENDORF; WESTENDORF, 2001).

Hormônios esteróides do tipo estrogênios, ultrapassam a membrana celular e interagem com seus receptores regulando a expressão gênica. Depois da ligação entre hormônios e receptor, dímeros formam-se e interagem com seqüências específicas do DNA, os elementos responsivos ao estrógeno (ERE), nas regiões promotoras dos genes envolvidas na transcrição. A transcrição é controlada pela interação do complexo receptor-ligante com proteínas coativadoras. Como resultado, ocorre aumento de expressão de genes, com síntese de moléculas de RNA mensageiro pela RNA polimerase, que serão traduzidos a proteínas, responsáveis por efeitos observados. A interação entre estrógeno, receptor e as proteínas coativadoras modificam a síntese de proteínas que levam à proliferação, inibição de apoptose, imortalização celular, entre outros (BRENTANI et al., 2003).

A região do cérebro hipotálamo e a glândula pituitária são as responsáveis por estimular a produção dos principais estrogênios endógenos E2, E1 e E3 que são sintetizados a partir do colesterol. Fabricado pelos ovários, em sua maior parte, o E2 é o mais potente dos três, atuando sobre a função reprodutiva, estimulando os folículos ovarianos a liberar os óvulos. Também estimula o aumento das contrações musculares das trompas de falópio que empurram o óvulo fertilizado até o útero. É o E2, ainda, que leva o útero a reagir à progesterona, revestindo-o com um endométrio mais espesso.

Além da função reprodutiva nas mulheres, o estradiol atua em outros tecidos e é responsável pela sua manutenção, garantindo a elasticidade da pele e dos vasos sanguíneos, a reconstituição dos ossos e a proteção de funções cerebrais como a

memória. Desse modo, um hormônio pode apresentar diferentes efeitos de acordo com a localização da célula alvo afetada, gênero do indivíduo e a espécie. Em mulheres, por exemplo, o estrogênio liberado pelo ovário prepara o útero para o ciclo menstrual, enquanto esse mesmo tipo de hormônio se liga a células dos ossos fortalecendo a massa óssea (BRENTANI et al., 2003). Seres humanos, outros mamíferos, demais vertebrados como pássaros, répteis, anfíbios e peixes e invertebrados apresentam muitas semelhanças nas glândulas endócrinas e na composição de seus hormônios, em particular dos hormônios esteróides, mostrando que todos estes grupos são afetados pela presença de estrógenos.

1.2 Compostos Estrogênicos no Ambiente: Fontes, Efeitos e Ocorrência

Efluentes domésticos, industriais e rejeitos provenientes da agricultura estão entre as maiores fontes de interferentes endócrinos estrogênicos para o ambiente (DESBROW et al., 1998). Ainda que os esgotos sejam fontes importantes, a poluição difusa em fontes não pontuais pode apresentar hormônios naturais e sintéticos, produtos de limpeza doméstica e industrial com nonilfenol (NP), plásticos contendo BPA e agroquímicos constituídos por alquilfenol e nonilfenol etoxilatos. Há compostos estrogênicos, cujos coeficiente de partição entre a fase sólida, em relação à concentração de matéria orgânica, é de médio a alto, indicando que a porção não dissolvida pode se associar a complexos orgânicos, ser adsorvida ao sedimento ou à matéria orgânica em suspensão. Dessa forma, existe a possibilidade de ingestão e absorção por animais e plantas, degradação ou transformação em formas mais ou menos móveis. Quando mobilizados, os complexos com compostos

estrogênicos podem voltar à coluna d'água ou alcançar a água subterrânea (CAMPBELL et al., 2006) (Figura 1).

Fonte: CAMPBELL et al., 2006. (modificado)

Figura 1. Representação esquemática dos possíveis processos e compartimentos ambientais envolvidos no destino de compostos estrogênicos no ambiente

No que se refere às consequências à saúde já observadas em pesquisas científicas, há evidências de que compostos estrogênicos são responsáveis por redução na contagem de espermatozoides, embora se saiba que há variação genética natural entre indivíduos de mesma idade, de idades diferentes e entre etnias (TOPPARI et al., 1996). Quando crônica, a exposição aos estrogênios leva à inibição da ovulação, à menarca precoce, menopausa tardia, aumento do risco de câncer de mama, desenvolvimento sexual anormal, incidência de ovários

policísticos, efeitos na fertilização e neurocomportamentais (BRENTANI et al., 2003). Não só o sistema reprodutivo, mas também o sistema imune é afetado pela ação de compostos estrogênicos. Porém, as concentrações e tempo de exposição aos compostos que podem causar tais efeitos ainda não estão bem esclarecidos (COLEMAN et al., 2005).

Populações de peixes em lagoas da Inglaterra foram encontradas com altas taxas de hermafroditismo ligadas à presença de IEs no ambiente. Os interferentes endócrinos podem induzir vitelogenina, lipoproteína encontrada somente em peixes fêmeas, e feminização dos órgãos sexuais de peixes machos (SUMPTER, 2002). Interferentes endócrinos como pesticidas, fitoestrogênios, fármacos, entre outros podem alterar a determinação sexual, diferenciação e maturação da biota. Em peixes teleósteos, ou ósseos, que representam 95% das espécies de peixes conhecidas, todos estes processos podem ser afetados independentemente do sexo.

Para os peixes em que o sexo ocorre separadamente em cada indivíduo, a expressão depende da determinação sexual cromossômica, já a diferenciação sexual, responsável pelo desenvolvimento das gônadas – sexo fenotípico - é relacionada ao ambiente. Esses fatores resultam na formação de machos ou fêmeas. Na maioria dos casos, os genes determinantes do sexo atuam no período de desenvolvimento do embrião. Já a diferenciação ocorre entre o período de eclosão até o período final de absorção do saco vitelínico. A exposição a hormônios estrogênicos nesse período pode levar à reversão completa e funcional dos órgãos sexuais, ainda que genotipicamente o organismo continue com a mesma determinação sexual.

No geral, em anfíbios, a determinação do sexo também se dá geneticamente pelos cromossomos sexuais, porém, independentemente do sexo genético, as características sexuais como diferenciação das gônadas, gametogênese, e ovulação ou espermição são induzidos pela presença de hormônios esteróides. A reversão sexual de animais machos a fêmeas já foi observada na presença de estrógeno.

Em répteis, os cromossomos sexuais estão presentes em algumas cobras e lagartos, porém ausentes em tartarugas, jacarés e crocodilos. Nesses animais, apesar da temperatura ser fator fundamental na determinação sexual dos embriões, a taxa de estrógeno é elemento importante. Embriões tratados com estrógenos geram fêmeas mesmo em temperaturas apropriadas para a formação de machos, e machos se desenvolvem quando a síntese de estrógeno é bloqueada ainda em temperaturas que favorecem a formação de fêmeas. Em crocodilos e tartarugas machos, os organismos em que a diferenciação sexual é determinada na incubação dos ovos e não geneticamente como nos mamíferos, compostos estrogênicos no ambiente podem redirecionar a diferenciação sexual, alterando também a maturação, produzindo fêmeas fenotipicamente normais, o que caracteriza a reversão sexual (JUNIOR, 2009).

Em pássaros e mamíferos a formação do ovário ou do testículo é determinada geneticamente e não por compostos exógenos. No entanto, como em outros vertebrados, a modificação no desenvolvimento de características sexuais secundárias em machos e fêmeas já foi observada quando ocorre exposição a compostos estrogênicos (ORLANDO; GUILLETTE, 2007).

Nas aves o desenvolvimento do aparelho genital depende da presença de hormônios femininos secretados pelos ovários, na sua ausência, a gônada torna-se

um testículo. Estudos apontaram para a relação entre exposição a estrógenos derivados de produtos de degradação de detergentes com impactos na reprodução e desenvolvimento de pássaros. Nos crustáceos, a muda e o desenvolvimento gonadal envolvem a ação de hormônios, sendo os hormônios esteróides os principais responsáveis pela ovogênese e vitelogênese nesses organismos.

Cnidários, crustáceos e equinodermos também produzem estradiol e, portanto, são sensíveis quando expostos a estrógenos. Já foram relatadas anomalias no desenvolvimento e reprodução de moluscos, gastrópodes e redução de fecundidade em crustáceos (CHEEK et al., 1998).

Desde a década de 1990, é possível encontrar estudos relativos à detecção de interferentes endócrinos no ambiente, relacionados aos efeitos descritos. Entre 1998 e 2004, foram encontradas concentrações de até 1,3 ng/L E1, E2 e EE2 em águas de rios da Polônia (BODZEK; DUDZIAK, 2006). Na Itália, próximo à região de Roma, foi detectada concentração de 0,33 ng/L de E3, 0,11 ng/L de E2, 1,5 ng/L de E1 e 0,04 ng/L de EE2 (BARONTI et al., 2000). Na Holanda foram detectadas concentrações máximas de 5,5 ng/L de E2, 4,3 ng/L de EE2, e 3,4 ng/L de E1 (BELFROID et al., 1999). Além da coluna d'água, verificaram tipos semelhantes de substâncias em efluentes e nos sedimentos dos rios destes países (BODZEK; DUDZIAK, 2006). Metcalfe et al. (2001) indicam que ftalatos, BPA, diversos pesticidas e produtos de degradação de surfactantes como o nonilfenol etoxilato já foram detectados em efluentes de plantas de tratamento de esgoto em Estados Unidos, Canadá e Europa (HANSEN et al., 1998; BENNIE, 1999).

O Serviço Geológico dos Estados Unidos realizou uma primeira avaliação em ampla escala da ocorrência de fármacos, hormônios e outros contaminantes

orgânicos em água, medindo a concentração de 95 compostos em 139 pontos de coleta em estados norte-americanos entre 1999 e 2000. Em 75% dos pontos amostrados mais de um contaminante foi encontrado. Entre os 30 compostos mais frequentes estavam o colesterol e os metabólitos de detergentes como NP. Hormônios da reprodução também foram encontrados em concentrações relativamente altas. 33 dos 95 compostos são conhecidos IE, todos eles foram detectados em pelo menos um ponto de coleta durante o estudo, mostrando que misturas de contaminantes estão presentes em diversas localidades (KOLPIN et al., 2002).

Kuch e Ballschmiter (2001) encontraram E2 (0,15-3,6 ng/L), E1 (0,1-41 ng/L), EE2 (0,1-5,1 ng/L), BPA (0,5-14 ng/L), NP (6,7-134 ng/L) e octilfenol (OP) (0,8-54 ng/L) em água superficial da Alemanha. Para águas tratadas foram detectados E2 (0,2-2,1 ng/L), E1 (0,2-0,6 ng/L), EE2 (0,15-0,5 ng/L), BPA (0,5-2 ng/L), NP (2,5-16 ng/L), e OP (0,2-4,9 ng/L). Em águas superficiais da China também foram encontrados NP (100-7300 ng/L) e nonilfenol etoxilatos (1000-97600 ng/L), para as águas tratadas da região verificou-se a presença de NP (10-2700 ng/L) e nonilfenol etoxilatos (100-300 ng/L); os mesmos compostos detectados na água bruta.

Kim et al. (2007) avaliaram a ocorrência de fármacos e interferentes endócrinos em águas superficiais e água para consumo humano na Coreia do Sul através de análises cromatográficas (LC-MS-MS). Foram encontradas concentrações de E1 entre 1,5 e 5 ng/L em rios e lagos. Em todas as águas superficiais havia até 2 ng/L de outros hormônios. Nas águas tratadas para consumo as concentrações de hormônio ficaram abaixo dos limites de detecção dos métodos analíticos.

Em estações de tratamento de esgoto (ETE) no Brasil, foram encontrados teores de 21 ng/L de E2, 40 ng/L de E1 e 6 ng/L de EE2 (TERNES et al., 1999). No estado do Rio de Janeiro, em águas superficiais do Rio Paraíba do Sul e do Rio Guandú, amostras submetidas a SPE e LC-MS-MS continham 0,34 a 2,57 ng/L de estriol-16-glucoronida; 1,1 ng/L a 7,34 ng/L de estradiol-17-glucoronida; 0,59 a 0,85 ng/L de estradiol-3-sulfato; 1 a 7,7 ng/L de E3; 36,2 a 276 ng/L de daidzein; 170 ng/L de coumestrol; 3,96 a 366 ng/L de genisteina; além de estrógenos e seus conjugados. Os corpos d'água estudados recebem resíduos de estações de tratamento de água, esgoto e efluentes industriais (KUSTER et al., 2009).

Em águas superficiais na região da cidade de Belo Horizonte em Minas Gerais, Moreira et al. (2009) avaliaram a presença de compostos estrogênicos por cromatografia líquida, e encontraram NP em concentrações de até 1918 ng/L em todas as amostras coletadas ao longo de um ano de monitoramento. Em 15% delas, havia também estrógenos naturais e sintéticos em concentrações de até 54 ng/L. Este estudo também mostrou que as primeiras etapas de tratamento de água para abastecimento, como pré-cloração, floculação e sedimentação não foram eficientes para remoção completa desses compostos.

A região de Campinas no Estado de São Paulo contou com o maior volume de informações acerca deste tema no Brasil. Nesta região, em pesquisa feita por Sodré et al. (2007), foram encontradas concentrações de 38 a 2510 ng/L de E2, 6,3 a 313 ng/L de EE2, e 5 a 1763 ng/L de BPA entre 2006 e 2007, quantidades superiores às encontradas para países como Alemanha, França, Holanda e Estados Unidos. O BPA também já foi detectado em águas superficiais, esgotos sem tratamento, efluentes de ETE e águas para consumo humano na região de

Campinas. As concentrações desse composto no esgoto bruto, efluente tratado e em águas superficiais foram semelhantes, indicando a potencial ineficiência do tratamento dos efluentes. Para águas tratadas, os valores encontrados atingiram 0,1µg/L de BPA, apesar de serem menores que os valores das águas superficiais, são maiores que os encontrados em água tratada de países como Alemanha, Espanha, Japão e Holanda (SODRÉ, 2006; SODRÉ et al., 2007). Sabe-se que concentrações acima de 1ng/L podem gerar efeitos adversos à biota e não foi verificado em que medida eles ocorrem na região (DESBROW et al., 1998).

Em outro trabalho, Sodré et al. (2010a) avaliaram a presença de uma gama maior de contaminantes emergentes de origem antropogênica em água de rios e água para consumo humano da região de Campinas através de SPE-GC-MS. Os compostos mais encontrados foram cafeína, colesterol, estigmasterol e BPA. Durante as estações de estiagem havia também E2 e E1. Na época, as concentrações de BPA detectadas em água para consumo humano chegaram a 190 ng/L, enquanto que a média para países desenvolvidos foi de 5 ng/L deste mesmo composto.

A partir da literatura revisada, verifica-se que há informações sobre presença e natureza de contaminantes estrogênicos em dezenas de países, sendo as técnicas de GC-MS e LC-MS-MS as mais utilizadas para análise, a depender da natureza dos compostos, por outro lado, poucos estudos vieram acompanhados de uma avaliação mais integrada entre a ocorrência, o potencial que os teores encontrados representam em gerar respostas biológicas e as consequências à biota que porventura já estejam ocorrendo.

1.3 Métodos para Avaliação de Atividade Estrogênica em Amostras Ambientais

A cromatografia gasosa (GC-MS), quando comparada à cromatografia líquida (LC-MS e LC-MS-MS), apresenta limites de detecção mais altos tendo em vista que as substâncias testadas podem estar presentes em concentrações próximas a nanogramas. LC-MS-MS tem limites de detecção satisfatórios, além de se mostrar mais adequada para compostos estrogênicos não-voláteis, que passam, portanto, por menos manipulação para testes via cromatografia líquida (TERNES et al., 2002; CAMPBELL et al., 2006; SODRÉ et al., 2010c). A principal limitação dessas técnicas analíticas é sua incapacidade de identificação e quantificação de todas as substâncias presentes na amostra que potencialmente gerem efeitos deletérios.

A atividade estrogênica, apesar de não representar efeito adverso per se, representa um indício de efeito biológico em consequência da presença de uma substância e ensaios *in vivo* e *in vitro* podem ser uma alternativa. Por isso, modelos e animais foram empregados para avaliação de águas e outras matrizes ambientais, possibilitando verificar a atividade estrogênica ou efeitos da amostra complexa mesmo sem o conhecimento de suas identidades químicas (FERREIRA, 2008).

Estudos que combinam técnicas da química analítica para verificar a presença de compostos-alvo selecionados com base em critérios de probabilidade de ocorrência, com a avaliação paralela dos efeitos causados pela amostra por meio de testes *in vivo* ou *in vitro* são definidos como Effect-directed analysis (EDA) (BRACK et al., 2008; STRECK, 2009). Para avaliação específica dos compostos

estrogênicos, alguns dos bioensaios mais comumente empregados neste tipo de avaliação são descritos a seguir.

Os ensaios *in vivo* visam aferir anomalias, reprodução e desenvolvimento de animais, permitindo verificar as consequências da absorção, distribuição, excreção das substâncias, efeitos diretos nos organismos (ANDERSON et al., 1996; BERG et al., 1999; HAYES et al., 2002; LEGLER et al., 2002). A avaliação do nível de vitelogenina no plasma de peixes machos é o mais comum indício de exposição a compostos estrogênicos. (GUTENDORF; WESTENDORF, 2001; LEGLER et al., 2002). Medida da massa uterina e cornificação da mucosa uterina em roedores na presença de estrógenos é outra possibilidade de estudo em mamífero (SONNENSCHNEIN; SOTO, 1998). Os testes *in vivo* são bastante úteis para verificar os efeitos de compostos em animais superiores, no entanto tendem a não ser dinâmicos do ponto de vista de monitoramento ambiental.

Como alternativa para estudo de maior número de amostras, há ensaios *in vitro* padronizados, como a proliferação induzida por compostos estrogênicos de células mamárias humanas cancerígenas ("MCF-7 cell proliferation assay"). Este método demora de 4 a 6 dias para gerar resultados e baseia-se na contagem do número de células. Compostos adicionados ao meio de cultura inibem a proliferação das células cancerígenas, já os compostos estrogênicos induzem sua proliferação pela anulação desse efeito, e as substâncias não estrogênicas não neutralizam o sinal inibitório presente no meio (SONNENSCHNEIN; SOTO, 1998).

Há métodos para medir a capacidade de substâncias de se ligarem diretamente a receptores hormonais, porém, não foram aplicados de forma ampla a amostras ambientais complexas e não indicam a ocorrência de efeitos causados.

Uma variação, é mensurar a capacidade de substâncias ou misturas de estimular transcrição de genes repórter inseridos em células contendo receptores de estrógenos para verificar atividade estrogênica destes compostos e amostras (ROUTLEDGE; SUMPTER, 1996).

Receptores de esteróides de mamíferos introduzidos em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* podem funcionar como ativadores de transcrição dependente de esteróides. Como resultado, estas leveduras são úteis para se estudar a função dos receptores de esteróides isolados de outros fatores, que confundem os resultados nas complexas células de mamíferos. As leveduras também são úteis pela facilidade de manipulação e manutenção, facilidade de se testar grande número de amostras de forma rápida e baixa capacidade metabólica das células (GAIDO et al., 2001). Os bioensaios com leveduras permitem estimar a contribuição de compostos não identificados para a potência estrogênica total encontrada na amostra (MURK et al., 2002).

Routledge e Sumpter (1996) desenvolveram o ensaio o YES (*Yeast estrogen Screen*) com linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* capazes de responder a agentes estrogênicos. As primeiras linhagens empregam o gene *lac-Z* como gene repórter da atividade estrogênica, por meio da expressão da enzima β -galactosidase. McDonnell et al. (1991) desenvolveram outra linhagem, com transformação da célula de *Saccharomyces cerevisiae* com o plasmídeo que contém o promotor metalotioneína ligado ao receptor para estrógeno humano (hER) no cDNA, e com o plasmídeo, o qual contém cópias do elemento de resposta a estrógeno (ERE) de sapo, antes do promotor ligado ao gene estrutural para β -galactosidase.

Para essas leveduras, ao ocorrer ligação a um ligante ativo no hER, o receptor ocupado modula a transcrição através da interação com fatores de transcrição, os ERE. Tal modulação causa a expressão do gene *lac-Z* e a enzima β -galactosidase é produzida e secretada no meio, onde metaboliza o substrato clorofenol-vermelho- β -D-galactopiranosida (CPRG), que se converte de amarelo em um produto vermelho, medido por absorbância através de um espectrofotômetro. Quanto maior a atividade estrogênica, maior a intensidade de coloração vermelha observada. Estes ensaios demoram em média 3 a 4 dias para realização e obtenção de resultados.

Nishikawa et al. (1999) desenvolveram outra linhagem de *S. cerevisiae* contendo o hER, ERE e também o gene *lac-Z* como repórter da atividade estrogênica. O método foi adaptado variando-se a concentração das culturas empregadas no ensaio, possibilitando assim a avaliação de atividade estrogênica após quatro horas de incubação. O ensaio mostrou respostas coerentes em termos de avaliação de atividade estrogênica de compostos químicos, porém, não foi empregado ainda para avaliação de amostras ambientais.

Gaido et al. (2001) desenvolveram linhagem contendo hER e plasmídeo repórter contendo dois ERE antes do gene que codifica para β -galactosidase. Nesse método, medem-se as mudanças de coloração do meio causadas pela produção da enzima β -galactosidase secretada, em contato com a substância cromogênica nitrofenil- β -D-galactopiranosida (ONPG) quando ocorre interação de compostos com os receptores de estrógeno, após incubação. Este método difere daquele desenvolvido por Rotledge e Sumpter (1996) principalmente pela substância cromogênica, que naquele caso é CPRG. Nesse estudo foram avaliados diversos

compostos químicos estrogênicos e os resultados obtidos foram comparáveis com os primeiros métodos tradicionais descritos. Não foram encontrados relatos na literatura do uso desse ensaio para avaliação de amostras ambientais.

García-Reyero et al. (2001) desenvolveram ensaio com leveduras recombinantes para avaliar atividade estrogênica em amostras ambientais (RYA – recombinant yeast assay). O ensaio é baseado em leveduras contendo gene para o receptor de estrógeno de mamíferos, elementos de resposta a estrógeno e também o gene *lac Z* como repórter da atividade estrogênica. Este método é também colorimétrico. A linhagem já foi utilizada para avaliação de águas superficiais e efluentes e os resultados serão abordados nas seções seguintes deste trabalho.

Balsiger et al. (2010), recentemente, desenvolveram outra linhagem de *S. cerevisiae* contendo gene do hER tipo α , ERE e gene *lac z* como repórter da atividade estrogênica. Neste caso, ao contrário dos métodos colorimétricos, é empregado substrato quimioluminescente (“Gal-Screen reagent”) para detecção da expressão de β -galactosidade induzida por estrógeno. Para esse ensaio, as culturas de leveduras crescem por uma noite e o tempo de ensaio restante é de aproximadamente 4 horas. Uma possível vantagem do método é que pode ser empregado em amostras sem extração e pré-concentração, no entanto, ainda precisam ser feitos testes para verificar sua aplicabilidade em amostras de água com concentrações baixas de compostos estrogênicos, porquanto só foi empregado para avaliar efluentes com grandes quantidades dessas substâncias.

Leskinen et al. (2005) desenvolveram uma linhagem de *S. cerevisiae* que expressa o gene humano do receptor de estrógeno do tipo α (ER α) e o gene de luminescência de vagalume (*luc*) como repórter. O teste consiste em medir atividade

estrogênica através da emissão de luz, quando há ligação de compostos estrogênicos com o receptor de estrógeno. Espera-se que quanto maior a potência da atividade estrogênica, maior a bioluminescência, medida por um luminômetro. Tendo em vista que o gene *luc* é utilizado como repórter, é necessário adicionar luciferina no meio de cultura das leveduras, para que a reação de produção de luz ocorra fora da célula. Esse teste também se baseia na indução da atividade hormonal em linhagens recombinantes de leveduras que expressam genes humanos (Ensaio Lesk).

Nesse método, o teste consiste em medir atividade de interferência endócrina em amostras, e paralelamente o teste deve ser realizado com uma linhagem de levedura com o gene de luminescência que se expressa de forma constitutiva (*Ctrl luc*) para avaliação da toxicidade da amostra, o que pode interferir nos resultados obtidos no ensaio. A levedura *S. cerevisiae* selvagem chamada BMA64-1A foi utilizada como organismo parental nas transformações realizadas para obtenção das linhagens. O plasmídio repórter com ERE e gene *luc* da bioluminescência foram integrados no cromossomo da levedura. A linhagem responsiva a hormônio foi construída pela inserção dessas sequências responsivas a estrógeno de um vetor, e integrando este vetor em loco do cromossomo da levedura. A linhagem foi ainda transformada com vetores de expressão contendo a sequência código de receptor de estrógeno humano do tipo α (Er α). Por fim foi feita transformação com cópia do plasmídio repórter, o qual contém o gene da luciferase (*luc*) controlado pelo promotor da levedura (LESKINEN et al., 2005).

Para construção de um plasmídio constitutivamente luminescente, um plasmídio teve o gene da luciferase de vaga-lume (*luc*) isolado. A linhagem controle

de toxicidade (*Crtl luc*) foi feita com transformação da linhagem parental BMA64-1A com cópia do plasmídio expressando luciferase sob o promotor constitutivo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (LESKINEN et al., 2005).

A figura 2 apresenta ilustração esquemática da linhagem ER α , responsiva a compostos estrogênicos para o método Lesk empregada neste trabalho.

Fonte: SANSEVERINO et al., 2005. (Adaptado)

Figura 2. Representação esquemática da linhagem *S. cerevisiae* contendo o receptor de estrógeno humano ER α , elementos de resposta a estrógeno (ERE) e o gene *luc*. Compostos estrogênicos atravessam a membrana da célula e se ligam ao receptor de estrógeno. Este complexo interage com ERE, iniciando a transcrição do gene *luc*

Salste et al. (2007), empregando a linhagem descrita anteriormente, avaliaram a atividade estrogênica de amostras de efluente municipal tratado na Finlândia. A atividade estrogênica verificada por bioensaios foi equivalente ao efeito medido em células expostas a concentrações entre 4,8 e 5,6 ng equiv.E2/L (resposta expressa em nanogramas equivalentes ao composto E2 por litro) para extratos de amostra por extração em fase sólida (SPE). A atividade estrogênica

esperada para estas amostras, considerando as quantidades de compostos detectados, era de 6,4 e 6,9 ng equiv. E2/L. As respostas biológicas observadas foram positivamente correlacionadas às respostas em atividade estrogênica esperada a partir de compostos quimicamente detectados. Em todas as amostras de efluentes E1 foi detectado em concentração aproximada de 60 ng/L, composto responsável pela maior parte da atividade estrogênica. Os resultados indicam que o bioensaio foi eficiente para avaliação de atividade estrogênica nas amostras ambientais e complementar aos resultados obtidos por análises cromatográficas.

Outra variação de ensaio com levedura foi desenvolvida por Sanseverino et al. (2005), com uma linhagem que recebeu um plasmídio contendo o hER e outro contendo o aparato completo de produção de luz de bactérias luminescentes *Photorhabdus luminescens* e *Vibrio harveyi* (genes *lux A*, *-B*, *-C*, *-D* e *-E*) (Método San). Foram desenvolvidas duas linhagens: BLYES (detecção de compostos estrogênicos) e BLYR (linhagem constitutivamente luminescente que detecta toxicidade das amostras). A linhagem parental utilizada foi desenvolvida por Routledge e Sumpter (1996).

A construção da linhagem BLYES incluiu inserção de ERE entre os promotores GDP e ADH1 sobre plasmídio da levedura que constitutivamente expressa *luxA* e *luxB* para criar o um novo plasmídio. Outro plasmídio foi também transformado com os genes *lux -C*, *-D* e *-E* de *Photorhabdus luminescens* e gene da flavina oxiredutase (*frp*) de *Vibrio harveyi* para prover o cofator FMNH₂, requerido para a reação de bioluminescência; resultando no bioreporter responsivo a compostos estrogênicos. A emissão de luz é resultante de reações do oxigênio molecular com FMNH₂ e um aldeído de cadeia longa para dar FMN, água e um

ácido graxo correspondente. A enzima luciferase catalisa uma função mista de oxidação do aldeído de cadeia longa e de FMNH₂ (SANSEVERINO et al, 2005) (Figura 3).

Esse método difere do ensaio desenvolvido por Leskinen et al. (2005), pelo fato de que as linhagens luminescentes nesse caso contêm todos os genes necessários para expressar proteínas responsáveis pelas reações de emissão de luz, não necessitando de adição de substrato ao meio. Este método vem sendo aplicado na avaliação de amostras de águas de rios nos Estados Unidos. Os ensaios com leveduras luminescentes são no geral pouco trabalhosos e rápidos, dando resultados em algumas horas de incubação, o que pode ser interessante para monitoramento de amostras ambientais.

Fonte: SANSEVERINO et al., 2005. (Adaptado)

Figura 3. Representação esquemática da linhagem *S. cerevisiae* contendo o receptor de estrógeno humano hER, elementos de resposta a estrógeno (ERE) e genes *lux -A*, *-B*, *-C*, *-D*, e *-E*, empregados no método San. Compostos estrogênicos atravessam a membrana da célula e se ligam ao receptor de estrógeno. Este complexo interage com EREs, iniciando a transcrição de *lux A* e *lux B*

Comparativamente, ensaios baseados na ativação da transcrição apresentam a vantagem sobre aqueles voltados para mensurar ligação com o receptor, pois permitem verificar a resposta biológica como consequência da ligação ao receptor e distinguir substâncias agonistas e antagonistas. Estes experimentos *in vitro* não provam que o efeito adverso possa ocorrer *in vivo*, mas são úteis para prevenção de riscos à saúde humana e adoção de medidas de precaução (INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS, 2002).

Entre os trabalhos *in vitro* com leveduras, a linhagem mais utilizada para avaliação de diferentes matrizes ambientais foi a desenvolvida por Routledge e Sumpter (1996). O protocolo experimental leva de 3 a 4 dias de incubação das amostras, o que poderia dificultar a avaliação de rotina. Linhagens luminescentes possibilitam que respostas sejam obtidas com mais rapidez. No que se refere ao *end point*, os métodos colorimétricos podem ser menos sensíveis que aqueles com as leveduras luminescentes, já que é necessária variação maior de resposta a estrógenos para que mudança detectável na coloração do meio ocorra, enquanto que em métodos luminescentes pequena variação na resposta já causa aumento na emissão de luz detectável por luminômetro (LINTELMANN et al., 2003).

A tabela 1 contém uma síntese com os principais métodos *in vitro* de avaliação específica da atividade estrogênica mediada por receptores de estrógeno humanos (hER) por meio de leveduras recombinantes.

Tabela 1. Ensaios *in vitro* para avaliação da atividade estrogênica por ativação transcricional de gene repórter mediada por hER de acordo com o tipo de célula empregada, o *endpoint* (ponto de avaliação) medido, o tipo de gene repórter utilizado e tempo para obtenção de resultados.

Organismo/Tipo de Célula	Gene Reporter	Procedimento	Referência
<i>S. cerevisiae</i>	Gene <i>lac-Z</i> β -galactosidase (colorimétrico)	4 dias de exposição	Mcdonell et al., 1991
		3-4 dias de exposição	Routledge; Sumpter, 1996
		4hs de exposição	Nishikawa et al., 1999
		exposição "overnight"	Gaido et al., 2001
		exposição "overnight"	García-reyero et al., 2001
	Gene <i>lac-Z</i> β -galactosidase (quimioluminescente)	2-4hs de exposição	Balsiger et al., 2010
	Gene <i>Luc</i> Luciferase, (luminescente)	2hs30 de exposição	Leskinen et al., 2005
	Genes <i>lux</i> <i>lux A</i> , - <i>B</i> Luciferase, Redutase, Transferase, Sintetase (luminescente)	4 hs de exposição	Sanseverino et al., 2005

1.4 Avaliação de Atividade Estrogênica em Amostras Ambientais Através de Análises Biológicas

A seguir, serão descritos os pontos mais relevantes das principais pesquisas relativas aos ensaios *in vitro* com leveduras para atividade estrogênica em amostras ambientais disponíveis na literatura e com resultados consistentes. Metcalfe et al. (2001) avaliaram alterações sexuais sofridas por peixes *Oryzias latipes* do Japão e as respostas do bioensaio YES com leveduras *S. cerevisiae* desenvolvido por Routledge e Sumpter (1996), quando submetidos a diferentes concentrações dos

compostos estrogênicos EE2, E2, E1, E3 e NP. Os quatro primeiros compostos geraram significativas alterações sexuais intersexo nos peixes e o NP baixas alterações. Tais resultados foram significativamente correlacionados aos obtidos para os ensaios com leveduras em termos de atividade estrogênica equivalente (METCALFE et al., 2001).

García-Reyero et al. (2001) avaliaram a presença de interferentes endócrinos em rios e ETE na Espanha e utilizaram bioensaios com leveduras recombinantes. Em amostras de água, efluentes tratados e não tratados foi detectada atividade estrogênica para quase todas as amostras testadas. No entanto, não foi quantificada a potência estrogênica, sendo os resultados expressos em presença ou ausência de resposta. Para as amostras de efluentes não tratados e tratados foi encontrado NP, E3, nonilfenol etoxilatos e dietilstilbestrol (DES). Já para na água superficial, havia NP e nonilfenol etoxilatos. O NP foi o composto mais presente e responsável por grande parte da atividade estrogênica.

Fawell et al. (2001) avaliaram quimicamente compostos estrogênicos (GC-MS, LC-MS e HPLC) em águas superficiais no Reino Unido. Os autores utilizaram também o ensaio YES (ROUTLEDGE; SUMPTER, 1996). Para a maioria dos pontos, a atividade estrogênica foi baixa variando entre não detectável a 2,3 ng equiv. E2/L. Nas águas brutas foram detectados E1, E2 e ftalatos. As águas tratadas para abastecimento não apresentaram compostos estrogênicos nem atividade estrogênica.

Murk et al. (2002) avaliaram a potência estrogênica de extratos de amostras ambientais de água de rios, efluentes tratados e não tratados da Holanda através de três ensaios *in vitro*, incluindo o YES. Os pesquisadores encontraram valores de

atividade estrogênica de até 4 pmol/L (1,1 ng equiv. E2/L) para águas de rios, 58 pmol/L (15,7 ng equiv. E2/L) para efluentes tratados e 317 pmol/L (86,3 ng equiv. E2/L). Foi observada redução da atividade estrogênica entre efluentes não tratados e tratados da ordem de 75% para os industriais e 95% para domésticos, devido a menor contribuição de hormônios nos efluentes industriais avaliados. Em todas as matrizes havia E2, E1 e EE2.

Para avaliar a atividade estrogênica em águas e estações de tratamento de efluentes principalmente domésticos na Alemanha, Pawlowski et al. (2003) também compararam bioensaios e análises químicas. Os autores indicam que o tratamento de efluentes foi de lodo ativado com processos de denitrificação, nitrificação e eliminação de fosfatos. Em extratos de amostras de água superficial, avaliaram atividade estrogênica entre 1,2 e 1,3 ng equiv. E2/L, tendo sido encontrado E2 através de análises químicas, além de fecal e fitoesteróides como colesterol e estigmasterol. Em efluentes tratados encontraram atividade estrogênica de até 20 ng/L em equivalentes de E2 e detectaram compostos como E2, E1 e EE2. De acordo com as análises químicas, concluiu-se que além de estrógenos naturais e sintéticos, os fitoesteróides, lactonas e flavonóides também contribuíram para a potência estrogênica medida, mesmo os fitoestrógenos apresentando atividade estrogênica até dez mil vezes menos potente que o composto E2. Além disso, apontam que outros compostos como alquilfenóis e BPA poderiam estar presentes, gerando atividade estrogênica, mas não inclusos como compostos-alvo nas análises químicas. Para os efluentes, a maior parte da atividade estrogênica pôde ser atribuída a estrógenos esteroidais. O estudo indica ainda que a concentração dos

compostos foi maior durante o período de inverno - águas frias - que no verão (PAWLOWSKI et al., 2003).

Efluentes de plantas de tratamento municipais dos Estados Unidos (EUA), após tratamento secundário, foram avaliados quanto à presença de compostos estrogênicos e atividade estrogênica através do YES. As ETE recebem tanto efluentes domésticos quanto industriais. A atividade estrogênica variou entre não detectável e 9 ng equiv. E2/L. Os pesquisadores concluíram que os ensaios *in vitro* subestimaram a real potência estrogênica das amostras em relação aos efeitos *in vivo*, atribuindo maior efeito estrogênico das amostras a outros mecanismos de ação, além da ligação com receptores de estrógenos (HUGGETT et al., 2003).

Aerni et al. (2004) avaliaram a atividade estrogênica através do YES e realizaram análises químicas por cromatografia gasosa (GC-MS) de compostos estrogênicos em ETE e água superficial na Suíça. As técnicas de tratamento dos efluentes não foram abordadas. Foram encontradas altas concentrações de E1, E2 e EE2 no efluente. A atividade estrogênica verificada através do ensaio YES é comparada às atividades estrogênicas esperadas de acordo com análises químicas baseando-se no conceito de aditividade de atividade estrogênica de cada composto. A atividade variou entre valores abaixo do limite de detecção até 53 ng equiv. E2/L. Para as análises químicas, a atividade estrogênica variou entre valores não detectáveis e 29 ng equiv. E2/L. Em amostras de água superficial antes das descargas de efluentes foi medida atividade estrogênica entre 1 e 1,9 ng equiv. E2/L. A atividade estrogênica esperada para esta região foi entre 0,5 e 1,1 ng equiv. E2/L. As águas continham NP, E1 e E3, utilizados no cálculo da atividade estrogênica esperada. No geral, amostras onde foram encontrados compostos com

baixa atividade estrogênica como NP, apresentaram baixos ou não detectáveis valores de atividade estrogênica calculada, mas apresentaram atividade estrogênica no bioensaios *in vitro*.

Céspedes et al. (2004) avaliaram a presença de compostos estrogênicos em extratos de amostras de água superficial e sedimentos em regiões urbanas e industriais de Portugal utilizando LC-MS e a atividade estrogênica através dos bioensaios com leveduras recombinantes. Os compostos com maior atividade estrogênica foram os estrogênios naturais e sintéticos (E2, E3, EE2, DES, e E1), seguidos de derivados de alquilfenóis (OP, NP, entre outros), e o composto BPA foi considerado menos estrogênico que os primeiros dois grupos. Em água superficial os mais frequentes foram nonilfenol monoetoxilato, nonilfenol dietoxilato e 4-nonilfenol em concentrações entre 0,1 e 44 µg/L. A atividade estrogênica verificada em diferentes amostras de água superficial variou entre 0,5 e 3,5 ng equiv. E2/L.

No ano seguinte, Céspedes et al. (2005) realizaram outro estudo no qual analisaram quimicamente (LC-MS) e avaliaram atividade estrogênica, através do ensaio chamado RYA descrito na seção anterior, das águas superficiais do rio Llobregat na Espanha do qual as águas são utilizadas para abastecer a cidade de Barcelona. Verificaram também esses parâmetros em efluentes lançados no rio. Nas águas superficiais foram encontradas concentrações em grandeza de mg/L de OP, NP, BPA, nonilfenol monoetoxilatos (NPEO1), nonilfenol dietoxilatos (NPEO2), dietilftalato (DEP), di-2-etilexil ftalato (DEHP), e de dibutil ftalato (DBP). A atividade estrogênica dessas águas variou entre 0,1 e 7,5 ng equiv. de E2/L, já a atividade estrogênica esperada esteve entre não detectável à 24 ng equiv. E2/L. Para os efluentes não tratados encontraram também OP, NP, BPA, NPEO1, NPEO2, DEP,

DEHP, DBP, as mesmas substâncias detectadas na água bruta, porém em maiores concentrações. Nesses efluentes a atividade estrogênica foi de 0,89 à 4,43 ng equiv. E2/L. Para os efluentes tratados foram detectados os mesmos compostos com exceção de DEHP e DBP, no geral a concentração foi maior que nas águas e menor que nos efluentes não tratados, com exceção do NPEO2 para alguns pontos. A atividade estrogênica observada variou entre 0,19 e 0,29 ng equiv. E2/L. O tratamento não removeu toda a atividade estrogênica do efluente.

Qirós et al. (2005) avaliaram atividade estrogênica via RYA e os compostos estrogênicos por LC-MS em águas superficiais de Portugal. A atividade estrogênica variou entre não detectável e 1,7 ng equiv. E2/L. Foram detectados OP, NP, nonilfenol etoxilatos e BPA. Os resultados indicam poluição de origem industrial e também da agricultura contribuindo com pesticidas não contemplados nas análises.

Vermeirssen et al. (2005) avaliaram a atividade estrogênica em rios da Suíça utilizando o ensaio YES e outros bioensaios *in vivo* e *in vitro*. Foi encontrada atividade estrogênica entre 0,3 e 2 ng equiv. E2/L no inverno e entre 0,4 e 7 no verão. Parte da variação da atividade estrogênica durante as estações do ano foi atribuída às diferenças nas vazões dos rios. Os compostos estrogênicos presentes nas águas não foram divulgados.

Beck et al. (2006) utilizaram o ensaio YES para avaliar a atividade estrogênica em águas superficiais da Alemanha. As amostras foram avaliadas por LC-MS-MS. As respostas obtidas por bioensaios variaram entre não detectáveis a 0,82 ng equivalentes de E2/L. A atividade estrogênica esperada chegou a 4 ng equiv. E2/L. Foram ainda identificados os compostos EE2, E1, BPA e NP. EE2 e E1 foram os responsáveis por causar a maior parte da atividade estrogênica no YES. As

diferenças entre os valores de atividade estrogênica medidos no ensaio YES e calculados a partir das substâncias detectadas na cromatografia devem-se provavelmente à atividade anti-estrogênica de compostos não estudados e que reduziram a atividade estrogênica nos bioensaios.

Nelson et al. (2007) avaliaram a atividade estrogênica de amostras de plantas de tratamento de efluentes na região de Vancouver, no Canadá. O tratamento inclui processos mecânicos para remoção de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e sólidos em suspensão e, posteriormente, tratamento biológico. Utilizaram análises químicas por cromatografia gasosa (GC-HRMS) e bioensaios como E-screen baseado em células MCF-7 (SOTO et al., 2004) e o YES. Nos efluentes tratados e não tratados foram encontrados E1, E2, E3, NP, BPA, entre outros. A atividade estrogênica chegou a 1400 ng equiv. E2/L através do bioensaio YES para os efluentes tratados e a 120 ng equiv. E2/L para os não tratados. No geral, a atividade estrogênica e teor de compostos foram maiores em efluentes tratados do que nos efluentes não tratados, pois as tecnologias de tratamento dos efluentes podem não removê-los ou gerar subprodutos estrogênicos ativos. Os autores atribuem as maiores atividades estrogênicas observadas nos efluentes tratados do que nos não tratados à conversão de compostos estrogênicos conjugados às suas formas não conjugadas. O ensaio YES mostrou resultados comparáveis aos outros bioensaios (D'ASCENZO et al., 2003).

Ma et al. (2007) estudaram a atividade estrogênica de água e efluentes domésticos, indústrias e hospitalares na China utilizando o ensaio YES. As técnicas de tratamento dos efluentes variam e não foram incluídas no estudo. A atividade estrogênica de efluentes industriais não tratados foi de 0,1 a 13,3 ng equiv. E2/L, já

dos efluentes tratados variou entre 0,03 a 1,6 ng equiv. E2/L. A atividade estrogênica de efluentes não tratados das plantas de tratamento de efluentes variou entre 0,3 e 1,7 ng equiv. E2/L sendo menor que para os efluentes industriais. Após o tratamento, a atividade estrogênica ficou entre 0,05 e 0,5 ng equiv. E2/L. Em águas superficiais, a atividade estrogênica foi de até 4,7 ng equiv. E2/L, superior a dos efluentes. Os efluentes contribuem para a atividade estrogênica verificada nas águas superficiais, o tratamento não removeu totalmente os compostos, mas possivelmente há lançamento de esgoto e efluentes não tratados nos corpos d'água.

Conroy et al. (2007) avaliaram a variação da atividade estrogênica de efluentes tratados na região de Tucson no Arizona (EUA) através do método YES, neste caso expressando os resultados em resposta equivalente à resposta biológica gerada pelo EE2 como referência. Ao longo do período de decloração, após tratamento biológico seguido de cloração, a atividade estrogênica do efluente decaiu de 20 a 0,4 ng equivalentes a EE2 por litro. Os níveis de atividade estrogênica do efluente inicial são vinte vezes maiores que os menores teores que causam efeitos fisiológicos em peixes. Avaliaram também que a atividade anti-estrogênica, medida como equivalente ao composto tamoxifen, também por bioensaios, teve aumento ao longo do período. A atividade anti-estrogênica verificada no ensaio YES poderia ser devida à interferência direta do composto com o receptor de estrógeno, mas poderia também ocorrer por outras vias, por exemplo, a ligação de compostos estrogênicos com organo-colóides o que diminui sua biodisponibilidade (HOLBROOK et al., 2005). Os autores concluíram que a atividade anti-estrogênica de compostos gerados ao longo de tratamento de efluente pode mascarar os resultados obtidos para os ensaios de atividade estrogênica de compostos, mesmo que os compostos

estrogênicos continuem nas amostras testadas. Os mecanismos que podem explicar redução de atividade estrogênica, mesmo sem remoção destes compostos, são competição para ligação com receptor de estrógeno de químicos sem atividade estrogênica ou ainda alterações químicas nas amostras que reduzem a tomada e biodisponibilidade dos compostos estrogênicos.

Tollefsen et al. (2007) testaram as potências de compostos estrogênicos de efluentes do setor de produção de óleo e gás offshore no mar do norte na Noruega, utilizando o YES. As amostras foram retiradas após tratamento para remoção de óleo e limpeza da água utilizada no processo, últimos passos antes do lançamento no mar. Os extratos foram analisados quanto ao teor de alquilfenóis por cromatografia gasosa (GC-MS). Foram verificadas atividades estrogênicas desde não detectáveis até 4 ng equiv. E2/L, principalmente associados à fase dissolvida dos efluentes em 13 das 20 amostras testadas, já que houve filtração para realização de extração das amostras.

Efluentes produzidos offshore da produção de óleo em plataformas marinhas geram misturas complexas de compostos que podem ser agonistas ao receptor de estrógeno (TOLLEFSEN et al., 2007). As análises cromatográficas resultaram na detecção de compostos alquilfenóis entre 30 a mais de 3000 µg/L, que podem em parte explicar a atividade estrogênica verificada para o bioensaio. A técnica de cromatografia gasosa pode ter altos limites de detecção para avaliação de interferentes endócrinos, por isso, é possível que compostos não detectados sejam responsáveis também pela atividade estrogênica.

No Canadá foi realizado estudo da atividade estrogênica (método YES) e avaliação de compostos estrogênicos em extratos de amostras efluentes tratados e

não tratados. Foram detectados estrógenos naturais e sintéticos (EE2, E1, E2 e E3) como grandes contribuintes da atividade estrogênica, NP, ftalatos e BPA como xenoestrogênios. A atividade estrogênica variou entre 9 a 106 ng equiv. E2/L (FERNANDEZ et al., 2007).

Li et al. (2008) avaliaram a atividade estrogênica de efluente tratado e não tratado de área agrícola na China através de bioensaios com as leveduras recombinantes. Os efluentes não tratados apresentaram atividade estrogênica entre 0,05 e 150,2 pmol equiv. E2/L, já os tratados apresentaram atividade entre 0,02 e 1,2 pmol equiv. E2/L.

Efluentes não tratados, tratados quimicamente e com técnicas biológicas em ETE nos Estados Unidos foram avaliados quanto à atividade estrogênica observada (medida) em bioensaios com leveduras recombinantes e atividade calculada (esperada) com dados de compostos alvo. As amostras não foram tratadas nem extraídas antes dos ensaios. Para os efluentes não tratados a atividade estrogênica medida variou de não detectável a 28,4 ng equiv. E2/L, já a atividade calculada variou entre 2,1 e 155,9 ng equiv. E2/L. Para os efluentes tratados a atividade calculada variou entre não detectável e 7,42 ng equiv. E2/L e para a calculada entre 0,16 e 24,23 ng equiv. E2/L (BALSIGER et al. 2010).

De modo geral, verifica-se convergência nos estudos entre atividade estrogênica observada e esperada, por outro lado, há grande variação entre substâncias encontradas, atividade estrogênica esperada e observada entre águas e efluentes nos diferentes países. Os resultados para avaliação de atividade estrogênica em diferentes matrizes ambientais através do emprego de ensaios com leveduras e análises químicas nas pesquisas descritas são sintetizados na tabela 2.

Tabela 2. Resultados encontrados em trabalhos avaliando a atividade estrogênica em extratos obtidos por SPE (extração em fase sólida) de amostras ambientais através de bioensaio com leveduras recombinantes e detecção de compostos de interesse por análises químicas.

(Continua)

Matriz	Potência da Amostra por bioensaio em ng equivalente a E2/L	Concentração medida por análises químicas	Local Estudado	Referências
Água Superficial	ND – 2,3	ND – 7,1 ng/L – E1 ND – 25 ng/L - E2 ND – EE2 1,3 – 4,9 µg/L - Ftalatos	Reino Unido	Fawell et al. (2001)
	ND -1,1	ND - 5,5ng/L – E2 ND - 5,3 ng/L -E1 ND - 4,3 ng/L -EE2 ND –1,1 17α-estradiol	Holanda	Murk et al., 2002
	1,2- 1,3	3,9 ng/L E2	Alemanha	Pawlowski et al., 2003
	1,0 – 1,9	Máx – 7,1 ng/L E3 Máx – 2,7 ng/L E1 Máx 0,49 ng/L NP ND –ng/L E2 ND –ng/L EE2	Suíça	Aerni et al., 2004
	0,5 – 3,5	0,1- 44 µg/L – NPEO1, NPEO2, NP	Portugal	Céspedes et al., 2004
	0,1 – 7,4	ND – 21,9 mg/L – OP 0,15 – 37,3 mg/L – NP ND – 2,97 mg/L – BPA ND – 6,97mg/L – NPEO1 ND – 3,17mg/L – NPEO2 0,22 – 6,85 mg/L - DEP ND – 3,09mg/L – DEHP ND – 1,3 mg/L - DBP	Espanha	Céspedes et al., 2005
	ND – 1,7	0,38 – 25,53 µg/L – NP 0,13 – 30,23 µg/L – OP 0,92 – 27,75 µg/L - NPEO1 0,66 – 12,64 µg/L – NPEO2 0,16 – 5,03 µg/L – BPA	Portugal	Quirós et al., 2005
	0,3 - 7	NA	Suíça	Vermeirssen et al., 2005
	ND- 0,82	0,1ng/l - EE2 4ng/l - E1	Alemanha	Beck et al., 2006
	0,1 – 4,7	NA	China	Ma et al., 2007

Tabela 2. Resultados encontrados em trabalhos avaliando a atividade estrogênica em extratos obtidos por SPE (extração em fase sólida) de amostras ambientais através do bioensaio YES (teste com leveduras recombinantes desenvolvido por Routledge; Sumpter, 1996) e detecção de compostos de interesse por análises químicas.

(Continuação)

Matriz	Potência da Amostra por bioensaio em ng equivalente a E2/L	Concentração medida por análises químicas	Local Estudado	Referências
Efluente tratado	0,04- 15,7	ND-12 ng/L - E2 ND-47 ng/L - E1 ND - 8 ng/L -EE2	Holanda	Murk et al., 2002 (modificado)
	12 - 20	1 – 5,6 ng/L - E2 ND – 1,5 ng/l -EE2 1,2 - 19 ng/L-E1 Máx- 380 ng/L fecal- e fitoesteróides	Alemanha	Pawlowski et al., 2003
	ND - 9	ND – 20 ng/L – E2 ND – 42ng/L – E1 ND – EE2 12 – 79 ng/L – NP ND - OP	EUA	Huggett et al.; 2003
	ND- 53	Máx 51 ng/L - E1 Máx 6 ng/L - E2 Máx 2 ng/L - EE2	Suíça	Aerni et al., 2004
	0,19 – 0,29	ND – 0,09 mg/L – OP 0,8 – 2,99 mg/L – NP ND – 0,34 mg/L – BPA ND – 10,6 mg/L – NPEO1 ND – 8,97 mg/L – NPEO2 0,56 – 10,21 mg/L - DEP ND – DEHP ND - DBP	Espanha	Céspedes et al., 2005
	~50 - ~1400	0.2 - 11ng/L - E2 3,3- 8,4 ng/L – E1 9,1 – 11,7 ng/L-E3 647-1513,2 ng/L NPs 41,9-71,8-BPA	Canadá	Nelson et al., 2007
	0.03 - 1.6	NA	China	Ma et al., 2007
	0.4 ng/L- 20 ng*	NA	EUA	Conroy et al., 2007
	<0.03 – 4	30-3000>µg/L -alquilfenóis	Noruega	Tollefsen et al., 2007
	4,8 – 5,6	Máx 60 ng/L - E1 Outros compostos	Finlândia	Salste et al., 2007
	0,005 – 0,33	NA	China	Li et al., 2008 (modificado)
				Belsiger et al., 2010

Tabela 2. Resultados encontrados em trabalhos avaliando a atividade estrogênica em extratos obtidos por SPE (extração em fase sólida) de amostras ambientais através do bioensaio YES (teste com leveduras recombinantes desenvolvido por Routledge; Sumpter, 1996) e detecção de compostos de interesse por análises químicas.

(Conclusão)

Matriz	Potência da Amostra por bioensaio em ng equivalente a E2/L	Concentração medida por análises químicas	Local Estudado	Referências
Efluente sem tratamento	ND – 86,3	10 - 48 ng/L -E2 10 - 140 ng/L -E1 ND - 10 ng/L -EE2	Holanda	Murk et al., 2002 (modificado)
	0,89 – 4,43	ND – 0,18 mg/L – OP 11,9 – 44,8 mg/L – NP ND – 6,98 mg/L – BPA ND – 19,3 mg/L – NPEO1 ND – 5,56 mg/L – NPEO2 1,06 – 12,97 mg/L - DEP 0,26 – 2,17 mg/L – DEHP 0,07 – 8,86 mg/L - DBP	Espanha	Céspedes et al., 2005
	~10 - ~120	0.1 - 11ng/L - E2 1,3-27,2 ng/L –E1 4,9-8,9 ng/L-E3 207,5-1287,3 ng/l-NP 2,9-61,1 ng/L-BPA	Canadá	Nelson et al., 2007
	0,1 - 13	NA	China	Ma et al., 2007
	0,01 – 40,9	NA	China	Li et al., 2008

Legenda:

ND – não detectado; NA – não avaliado, Máx – valor máximo encontrado.

E1 – estrona, E2 – 17 β -estradiol, E3 – estriol, EE2 – 17 α -etinilestradiol, BPA – bisfenol A, OP – octilfenol, NP – nonilfenol, NPEO1 – nonilfenol monetoxilatos, NPEO2 – nonilfenol dietoxilatos, DEP – dietilftalato, DEHP – di-2etilhexil ftalato, DBP – dibutil-ftalato

*resultado medido em ng equivalente a EE2 por litro

Este trabalho tem por objetivo avaliar a atividade estrogênica de águas brutas de mananciais e de águas tratadas para abastecimento no Estado de São Paulo por meio de bioensaios com linhagens de leveduras luminescentes geneticamente modificadas e capazes de gerar respostas biológicas rápidas. O objetivo compreende também a comparação dos resultados dos bioensaios com dados de análises químicas de compostos estrogênicos nas águas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento Experimental

Para atingir os objetivos da pesquisa foram seguidas as seguintes etapas:

1) Avaliação das amostras de água e efluente utilizando dois bioensaios com leveduras *S. cerevisiae* que contêm gene de estrógeno humano, um deles com uma linhagem contendo o gene *luc* (vagalume), linhagem ER α , e a outra sequência de genes *lux* (bactérias) como repórter, linhagem BLYES, comparando os resultados obtidos.

2) Comparação das respostas dos bioensaios com os resultados das análises cromatográficas das amostras de águas e efluente.

3) Comparação dos resultados encontrados neste trabalho com outras pesquisas relativas à avaliação de atividade estrogênica em matrizes ambientais.

Os bioensaios foram realizados nos mesmos em extratos orgânicos utilizados em análises físico-químicas. As amostras foram submetidas a extração em fase sólida (SPE); e a determinação e quantificação dos interferentes endócrinos foram realizadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com triplo-quadrupolo após ionização electrospray no modo negativo (LC-MS-MS), conforme descrito por Sodré et al (2010c). As análises cromatográficas foram realizadas pelo Laboratório de Química Ambiental da Universidade Estadual de Campinas (LQA – UNICAMP), sob coordenação do Dr. Wilson Figueiredo Jardim como parte do Projeto Temático Intitulado: “Ocorrência e Atividade Estrogênica de Interferentes Endócrinos em Água para Consumo Humano e em Mananciais do Estado de São Paulo” do qual a presente pesquisa é parte integrante. Nos itens 3.2

e 3.3 foram apresentados resumidamente os métodos utilizados para coleta, extração e análises.

Os bioensaios foram efetuados na University of Turku em cooperação com Dra. Piia Leskinen e na University of Tennessee em cooperação com Dr. John Sanseverino. As respectivas Universidades aprovaram a ida como mestranda e cederam a infraestrutura de seus laboratórios para realização dos experimentos. Os procedimentos estão descritos no item 3.4.

3.2 Caracterização da coleta e dos pontos amostrais

Foram coletadas amostras de águas brutas (1 litro) e tratadas (4 litros) provenientes de mananciais do Estado de São Paulo. As amostras de água bruta foram coletadas em junho de 2009 e de água tratada em abril e em junho de 2009 em cada ponto estudado.

Após a coleta, os frascos foram selados com papel alumínio, tampados e acondicionados em caixa de isopor para transporte. Durante todo o período de amostragem foram utilizadas luvas nitrílicas limpas para evitar a contaminação das amostras. As amostras foram preservadas a 4 °C, em refrigerador, até a realização dos procedimentos de extração dos compostos-alvos no máximo após 24 horas após a coleta.

Os pontos de coleta de água bruta foram próximos aos locais onde a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) realiza o seu monitoramento, sendo sempre o local mais próximo possível da captação de água para tratamento. A CETESB publica anualmente dados sobre a qualidade das águas

monitoradas. Informações publicadas em 2008 revelam que os mananciais estudados apresentam diferentes níveis de poluição de acordo com o índice de qualidade das águas para fins de abastecimento (IAP), que leva em conta diversos parâmetros físicos, químicos e biológicos da água. Todas as águas brutas foram coletadas predominantemente em regiões urbanas e industriais. As águas tratadas foram coletadas em locais públicos de acesso irrestrito.

A figura 4 apresenta os locais de coleta do projeto.

Figura 4. Localização dos pontos amostrais para águas brutas e tratadas

Descrição dos pontos:

- 1) Campinas: localiza-se no Rio Atibaia, próximo ao ponto de captação de água da ETA que abastece o município de Campinas. As amostras de água tratada foram coletadas no Parque Municipal de Campinas.
- 2) Atibaia: localiza-se no rio Atibaia. A coleta foi realizada nas margens do rio, próximo ao ponto de captação de água pela Estação de Tratamento de Água da sede da Companhia de Saneamento Ambiental de Atibaia. As amostras de água tratada pela ETA foram coletadas em prédio da prefeitura municipal de Atibaia.
- 3) Guarulhos: ponto localizado no Reservatório Tanque Grande utilizado para abastecimento de parte da população de Guarulhos. As amostras foram coletadas próximas ao ponto de captação de água para tratamento e as amostras de água tratada foram coletadas em um Posto de Saúde da Região.
- 4) Barueri: é localizado no Rio Cotia, próximo à região de captação de água da Estação de Tratamento de Água (ETA) do Baixo Cotia, responsável por distribuir água para região de Barueri, Jandira e Itapevi. A coleta foi feita em ponto 500 m à jusante da região de captação de água pela referida ETA. As amostras de água tratada da rede de distribuição nesta região de Barueri foram coletadas no Velório Municipal.
- 5) Cerquilha: a amostra de água bruta foi coletada na Estação de Tratamento de água de Caldana no Rio Sorocaba, antes do processo de tratamento que distribui água para o município de Cerquilha. As amostras de água

tratada foram coletadas no Ginásio de Esportes Mário Pilon no município de Cerquilha.

- 6) Efluente Hospitalar: coletado na região da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

3.3 Extração e Pré-concentração das Amostras

Foi feita extração em fase-sólida (SPE) por método modificado e validado por Sodré et al. (2010b). O eluato foi seco sob gás N₂ ultrapuro. Uma porção dos extratos foi separada para análises cromatográficas e outra para análises biológicas.

Para os bioensaios, o eluato seco foi ressuscitado em DMSO, posteriormente, a solução foi ajustada com água ultrapura esterilizada para atingir concentração de DMSO 1% no bioensaio. Os compostos químicos puros foram testados fazendo-se diluições seriadas entre concentrações de 10⁻¹⁴ à 10⁻³ M. Foram também feitas diluições seriadas dos extratos das amostras de água bruta, tratada e efluente em fatores de concentração de 1000 a 0,0025 vezes, dependendo da quantidade de extrato disponível e do tipo de amostra testada. Desse modo, um volume de 4 Litros foi ressuscitado em 4 mL de solução de DMSO e diluições feitas a partir dessa primeira solução. Foram testadas número maior ou menor de concentrações de acordo com o volume de amostra, sendo no mínimo 5.

3.4 Bioensaios

Amostras de água e compostos químicos puros com reconhecida atividade estrogênica Estrona (E1), o 17 β -estradiol (E2), o Estriol (E3), o 17 α -etinilestradiol (EE2), o Bisfenol A (BPA) e Dietilstilbestrol (DES) foram analisados nos dois bioensaios. Ambos são baseados no emprego de *S. cerevisiae* recombinantes, que contêm o receptor de estrógeno humano (hER) e emitem luz quando em contato com compostos estrogênicos. Os compostos avaliados foram selecionados de acordo com dados da literatura acerca da frequência de ocorrência no ambiente, tanto em pesquisas internacionais quanto no Brasil, conforme revisão bibliográfica prévia.

Foi empregado o método descrito por Leskinen et al. (2005) e denominado aqui de método Lesk, e o método desenvolvido por Sanseverino et al. (2005), chamado método San. As linhagens empregadas para cada um dos bioensaios foram descritas na seção 1.3 e todos os procedimentos do ensaio utilizados neste trabalho constam nos itens 3.4.1 e 3.4.2 a seguir.

3.4.1 Método Lesk

3.4.1.1 Meios de Cultura e Soluções

Os meios de cultura e soluções utilizados para crescimento de leveduras e ensaios são descritos na tabela 3.

Tabela 3. Fórmula do meio de cultura do método

Composto	Concentrações	Esterilização	Marca
Yeast nitrogen base w/o amino acids (YNB)	5g/150 mL	Filtração 0,22µm	BD
Glicose	15g/150 mL de solução YNB	Filtração 0,22µm	-
Yeast synthetic drop-out mix sem leu,his,ura,trp	-	Filtração 0,22µm	Sigma
Bacto Agar	Agar 2%	Autoclave	BD
Histidina	2g/L	Filtração 0,22µm	Sigma
Adenina hemissulfato	3,7 g/L	Filtração 0,22µm	Sigma
Leucina	10 g/L	Filtração 0,22µm	Sigma
Triptofano	2g/L	Filtração 0,22µm	Sigma
D-luciferina	2 mmol/L	Filtração 0,22µm	Biothema
Citrato de sódio	0,2 mol/L (pH 5)	Filtração 0,22µm	Sigma
Ácido cítrico	0,2 mol/L	Filtração 0,22µm	Sigma
Citrato Trisodio	0,2 mol/L	Filtração 0,22µm	Sigma

O meio de cultura para ensaio e placas foi preparado de acordo com as proporções indicadas na Tabela 4. Para preparo de meio de cultura em placas e meios de crescimento de leveduras, foi feita solução com mistura de aminoácidos contendo 10 mL de solução de histidina, 10 mL de solução de adenina e 10 mL de solução de leucina, nas concentrações indicadas. A solução mista foi armazenada sob temperatura ambiente.

Para a linhagem controle de luminescência (*Ctrl luc*), às soluções listadas na tabela 4 adicionou-se ainda 1,5 mL de solução de triptofano, para a linhagem Era este aminoácido não foi colocado no meio. Após o preparo, o meio foi armazenado em refrigerador, 30 mL deste meio foi distribuído por placa.

Tabela 4. Fórmula do meio de cultura para placas e meio de crescimento

Composto	Concentrações	Quantidades
Yeast nitrogen base w/o amino acids(YNB) + Glicose	5gYNB/15g Glicose/150 mL	120 mL
Bacto Agar (para placas)	Agar 2%	120 mL
Solução Histidina / Adenina/ Leucina	10mL His/10mL Ade / 10mL Leu	4,5mL
Triptofano	2g/L	1,5 mL (<i>Ctrl</i> <i>Luc</i>)

Para o meio para crescimento das linhagens, foi preparada solução contendo os mesmos compostos que os utilizados para meio de placas (Tabela 4), mas sem adição de Agar.

Para a solução de luciferina, necessária para a reação de luminescência, foi misturado 65 mL de solução de citrato de trisódio, 35 mL de solução de ácido cítrico e D-luciferina até atingir concentração de 2mmol/L desta. A solução final foi guardada a -20 °C ao abrigo da luz. No momento do preparo, foram adicionados 5 mL de água ultrapura estéril a alíquotas de 5 mL de solução de luciferina.

3.4.1.2 Protocolo do bioensaio Lesk

As culturas previamente congeladas em glicerol 30% a -70°C, provenientes de culturas isoladas em placas foram utilizadas nos ensaios. Ampolas com 1 mL de cultura são adicionadas a frascos contendo 10 mL de meio para crescimento. A solução foi mantida sob agitação em 250 rpm (rotações por minuto), por cerca de 18 horas a 30 °C. No dia do ensaio foi feita a medida de absorbância da cultura em 600 nm (nanômetros) (DO_{600}). As culturas foram diluídas até a obtenção de soluções

com DO (densidade óptica) 0,4. Em seguida, foram levadas novamente a agitação a 250 rpm por aproximadamente 2 horas, até atingirem DO entre 0,6 e 0,8.

Em microplaca de 96 poços, foram pipetados 50 µL de extrato de amostra, composto químico ou controle positivo, e 50 µL de cultura. Após agitação das microplacas por 20 segundos, em shaker, as mesmas foram incubadas a 30 °C por 2,5 horas. Em seguida, as placas foram agitadas novamente por 20 segundos e, em cada poço, adicionou-se 100 µL da solução de luciferina. As microplacas pretas com 96 orifícios foram agitadas para realização da medida de luminescência no luminômetro Perkin Elmer. Os resultados são obtidos em unidades de emissão luz (counts per second – CPS) e são específicas de cada aparelho de medição.

Os ensaios foram realizados simultaneamente com as linhagens ERα (responsiva a estrógeno) em duplicata com *Ctrl luc* (controle de toxicidade) utilizando para ambas as mesmas quantidades de cultura, amostras e solução de luciferina. Utilizou-se concentrações de 1µM à 2,5 pM por orifício do controle positivo 17β-estradiol (calculado da molaridade considerando a adição de um volume de 50µL de cultura e 100 µL de solução de luciferina), calculou-se, portanto, a molaridade após adição da cultura.

A figura 5 ilustra as etapas do Método Lesk.

Figura 5. Ilustração dos procedimentos empregados no método Lesk

3.4.2 Método San

3.4.2.1 Meios de Cultura e Soluções para o Método San

O meio de crescimento e incubação (YMMG) é composto de meio mínimo (YMM) (Tabela 5), soluções de vitaminas (Tabela 6) e outros suplementos.

Tabela 5. Fórmula de preparo do meio mínimo (YMM).

Composto	Quantidade de solução/composto para 1L de meio	Concentração da Solução	Marca
KH ₂ PO ₄	13,61 g	-	Fisher
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,98 g	-	Fisher
KOH (pellets)	4,2 g	-	Fisher
MgSO ₄	0,2 g	-	Sigma
Solução de FeSO ₄	1 mL	40mg/50mL H ₂ O	
L- Histidina	50 mL	1g/100mL	Sigma
Adenina	10 mL	0,5g/100mL	Sigma
L-arginina	2 mL	1g/100mL	Sigma
L-metionina	2 mL	1g/100mL	Sigma
L-tirosina	3 mL	1g/100mL	Sigma
L-isoleucina	3 mL	1g/100mL	Fisher
L-fenilalanina	2 mL	1g/100mL	Sigma
L-ácido glutâmico	2 mL	5mg/100mL	Sigma
L-valina	5 mL	3g/100mL	Sigma
L-serina	10 mL	3,75g/100mL	Sigma

O meio mínimo contendo os compostos listados na Tabela 5, mas sem os aminoácidos é preparado com água ultrapura, autoclavado a 121°C por 10 minutos e em seguida misturado às soluções de aminoácidos preparadas separadamente e também autoclavadas a 121°C por 10 minutos.

As concentrações das soluções de vitaminas utilizadas para preparo do meio de crescimento (YMMG) foram apresentadas na tabela 6.

Tabela 6. Fórmula de preparo das soluções de vitaminas para volume final de 500 mL de solução.

Composto	Quantidade - 500mL	Marca
Tiamina	20 mg	Sigma
Piridoxina	20 mg	Sigma
Ácido Pantotenico	20 mg	Sigma
Inositol	100 mg	Fisher
Biotina	50 mL (2mg/100mL)	

A solução de vitamina foi preparada com água ultrapura, esterilizada por filtração (0,22 µm) e guardada em geladeira protegida da luz.

Para cada litro de meio para crescimento (YMMG) foi adicionado:

- 1) 854,5mL de meio mínimo YMM (Tabela 5)
- 2) 10 mL de solução de Vitamina (Tabela 6)
- 3) 100 mL de solução de Glicose 20%
- 4) 25 mL de solução de ácido aspártico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) - 4mg/mL (Cupric Sulphate – Fisher – C493)
- 5) 8 mL de solução de treonina - 24mg/mL (Sigma – T8441)
- 6) 2,5 mL de solução de Sulfato de Cobre II - 0,01g/mL (Cupric Sulphate – Fisher – C493)

A solução foi esterilizada por filtração 0,22 µm. O pH deve ficar ao redor de 7. Para meio em placa adicionar 1,3 g de Agar Nobre por litro de meio de crescimento.

Utilizou-se microplacas pretas (opacas) de 96 orifícios. As placas foram cobertas durante o teste com adesivo BREATH EASY – USA (Scientific Diversified Biotech cod # 91236100).

A curva dose-resposta de substâncias foi construída a partir do ensaio com 18 diluições, sendo as concentrações de 1 μ M à 2,5 pM por orifício do controle positivo 17 β -estradiol. O cálculo da molaridade considerando a adição de um volume de 50 μ L de cultura, portanto, a molaridade após adição da cultura.

3.4.2.2 Protocolo do Ensaio San

As linhagens foram armazenadas congeladas a -70°C (crescimento em caldo YMMG) e glicerol (0,5 mL de cultura *overnight* e 0,5 mL de glicerol 40%, esterilizado). As culturas vieram de colônias isoladas, estriadas em meio de crescimento com Agar, que duram até um ano a -70°C.

Nos dias anteriores aos respectivos ensaios, a linhagem foi descongelada e rapidamente despejado o conteúdo em 30 mL de meio de crescimento (YMMG). As culturas foram vigorosamente agitadas (~200 rpm) a 28°C por ~20-22 horas, até que a densidade óptica, DO₆₀₀, medida por espectrofotômetro, atingisse em torno de 1.

Após isto, a cultura que cresceu “overnight” (DO₆₀₀=1) foi centrifugada e ressuspensa em meio de crescimento, de modo a se obter uma cultura com DO₆₀₀=4. As culturas concentradas foram adicionadas aos orifícios com pipeta multicanal (50 μ L/orifício). O 17 β -estradiol foi testado entre concentrações de 1 μ M – 2,5 pM, os compostos químicos puros foram testados em diluições com concentrações seriadas de 10⁻¹⁴ à 10⁻³ M, sendo a concentração máxima e mínima

definidas conforme resultado obtido para a substância referência E2. As amostras ambientais, passaram o SPE, foram secas e posteriormente concentradas em até 1000 vezes. Posteriormente foram feitas diluições seriadas de modo a se obter 18 soluções com concentração decrescente, foi adicionado 50µL de solução de amostra por orifício mais 50µL de cultura. Para mensurar a atividade estrogênica, foi considerada a resposta verificada na diluição de extrato concentrado em até 100 vezes com relação à amostra original com o objetivo de evitar efeitos de matriz em extratos muito concentrados, o que poderia levar a aumento de toxicidade ou mascarar efeitos estrogênicos. As placas foram cobertas com adesivo Easy Breath. A leitura de luminescência foi feita após 4 horas de incubação em luminômetro Perkin-Elmer Victor2 Multilabel Counter, com período de medição de 1s por orifício da microplaca. Foi utilizado DMSO a 1% do volume final de orifício da microplaca para compostos puros e amostras, percentual que não causa toxicidade. Os testes foram feitos em triplicata e em duplicata com a linhagem BLYR. O resumo do método de ensaio está apresentado na figura 6.

Figura 6. Ilustração esquemática dos procedimentos e etapas empregados para realização do bioensaio de acordo com o método San.

3.5 Análise dos Dados

As concentrações dos compostos puros foram expressas em termos de percentual da resposta máxima, em função da maior luminescência, obtida para o composto referência E2, por conta disto expressas em equivalentes de E2. Para amostras ambientais foram expressas em termos de porcentagem da resposta máxima obtidas pelas mesmas culturas quando submetidas às diluições de E2 versus os fatores de concentração; conforme o número vezes a amostra foi concentrada após o processo de extração, secagem e ressuspensão em solução de DMSO, até o máximo de 1000x em relação à amostra original. As respostas dos ensaios medidas em unidades de luminescência CPS no luminômetro, as quais são

unidades específicas de cada aparelho, foram igualmente normalizadas em relação à resposta máxima para E2.

O critério de positividade nas amostras ambientais em termos de atividade estrogênica significativa foi baseado na média da resposta das réplicas de controle negativo, contendo somente cultura de leveduras com solução de solvente DMSO1% e sem compostos estrogênicos, adicionadas de três desvios padrão (N=6). A CE_{50} (concentração efetiva – 50%) dos compostos foi calculada empregando-se o programa MS Excel e de acordo com o ponto médio da porção linear da curva dose-resposta levando-se em conta a resposta mínima dos controles negativos com as linhagens BLYES e ER α (SANSEVERINO et al., 2009). O limite de detecção (LD) dos métodos foi a concentração de 17 β -estradiol (E2) que provoca efeito igual ao critério de positividade (menor resposta positiva). As leituras de luminescência obtidas com a linhagem ER α (método Lesk) e BLYES (método San) foram corrigidas no caso de existir toxicidade da amostra com a linhagem *Ctrl luc* (método Lesk) e BLYR (método San) – linhagens de controle da toxicidade, desde que a toxicidade desta não fosse maior que 1,5 (relação entre a luminescência de background e a luminescência com amostra). Havendo toxicidade, os ensaios foram repetidos utilizando concentrações menores ou desconsideradas as doses tóxicas para avaliação da atividade estrogênica.

As potências relativas (Toxic Equivalent Coefficient – TEQ) indicam a relação de potência entre um composto ou mistura e o controle positivo E2, e são avaliadas através da relação da CE_{50} de E2 ($CE_{50}E2$) com os valores de CE_{50} para cada composto (CE_{50}), de acordo com a seguinte expressão:

$$TEQ = CE_{50}E2 / CE_{50}$$

Para medir as concentrações equivalentes a 17 β -estradiol (E2) para cada amostra (ng equiv. E2/L) através dos resultados dos bioensaios, as respostas consideradas positivas para diferentes diluições de extrato foram expressas em termos das concentrações de E2 sobrepostas à curva que resultaram nas respostas equivalentes. Na avaliação das amostras e substâncias através de bioensaios estas podem ser estrogênicas, tóxicas ou ainda estrogênicas e tóxicas. A partir dos resultados obtidos com as linhagens responsivas a estrógenos e linhagens de controle de toxicidade é possível concluir sobre a toxicidade e atividade hormonal. Os dados de toxicidade foram utilizados para evitar interferências na estimativa da atividade estrogênica e não foram inseridos nos resultados finais deste trabalho, mas constituíram os passos previamente seguidos para tomada de decisão sobre a natureza das amostras e substâncias testadas quanto à toxicidade e/ou atividade estrogênica, conforme ilustrado na figura 7.

Figura 7. Ilustração das etapas seguidas na tomada de decisão para determinar se compostos ou amostras ambientais são estrogênicos; tóxicos; estrogênicos e tóxicos, ou ainda, não estrogênicos e não tóxicos.

O potencial estrogênico esperado de cada amostra ambiental foi calculado com base nas substâncias-alvo detectadas através das análises cromatográficas para normalização e comparados com a atividade estrogênica medida nos bioensaios (observada). A contribuição de diferentes compostos químicos detectados foi expressa como a somatória das potências relativas (TEQ) de cada um dos compostos detectados e considerando a concentração deste composto encontrada na amostra (MURK et al., 2002; SALSTE et al., 2007), como ilustra a seguinte expressão:

$$\sum \text{Equivalentes de E2} = \sum \text{TEQ} \times \text{Concentração}$$

Os equivalentes de E2 por litro foram calculados de acordo com a equação e considerando as potências relativas de compostos encontrados nos diferentes ensaios desenvolvidos neste trabalho e de acordo com dados da literatura (MURK et al., 2002; SANSEVERINO et al., 2009).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 7 mostra as características físico-químicas das substâncias investigadas nas amostras ambientais avaliadas nesta pesquisa quanto às suas respostas biológicas e em paralelo pela equipe do Laboratório de Química Ambiental da UNICAMP através das análises cromatográficas.

Tabela 7. Compostos avaliados por análises cromatográficas, com suas respectivas fórmulas, massas molares e abreviações

Composto	Fórmula	Massa exata (g/mol)	Abreviação
Estrona	$C_{18}H_{22}O_2$	270,16	E1
17 β -estradiol	$C_{18}H_{24}O_2$	272,38	E2
Estriol	$C_{18}H_{24}O_3$	288,17	E3
17 α -etinilestradiol	$C_{20}H_{24}O_2$	296,18	EE2
4-n-nonilfenol	$C_{15}H_{24}O$	220,18	nNP
4-n-octilfenol	$C_{14}H_{22}O$	206,17	nOP
Bisfenol A	$C_{15}H_{16}O_2$	228,12	BPA
Dietilstilbestrol	$C_{18}H_{20}O_2$	268,12	DES

O limite de detecção (LD) das análises cromatográficas foi adotado para o cálculo da atividade estrogênica esperada em cada amostra, com base nas substâncias-alvo indicadas na Tabela 7. Os limites de detecção encontrados pela equipe do LQA foram calculados para amostras concentrados em até 8000 vezes. Para estrona (E1) o LD foi de 0,09 ng/L, para 17 β -estradiol (E2) foi de 0,07 ng/L, para estriol (E3) foi de 0,08 ng/L, para 17 α -etinilestradiol (EE2) foi de 0,1 ng/L, para 4-n-nonilfenol (nNP) foi de 0,12 ng/L, para 4-n-octilfenol (nOP) foi de 0,11 ng/L, e para bisfenol-A (BPA) de 0,28 ng/L (SODRÉ et al, 2010c).

4.1 Avaliação de 17 β -estradiol (E2)

Tendo em vista que o 17 β -estradiol (E2) é utilizado como controle positivo e referência, o resultado em atividade estrogênica para este composto foi avaliado previamente às outras substâncias para calibração. As figuras 8 e 9 mostram as curvas dose-resposta para o método Lesk (Figura 8) e San (Figura 9), em termos de porcentagem da resposta máxima versus concentrações de E2 testadas. O limite de detecção (LD) encontrado para método Lesk foi de 13 ng/L. Para o método San o limite de detecção foi de 9 ng/L. Considerando que neste trabalho foi possível testar extratos de amostras concentrados em cem vezes, os limites de detecção finais calculados para os bioensaios foram 0,13 ng/L (método Lesk) e 0,09 ng/L (método San), em contraposição às altas concentrações dos extratos feitas para análises cromatográficas. Os limites de detecção de substâncias adotados nos bioensaios para a quantificação da intensidade da atividade estrogênica dependem diretamente da potência dos compostos, já os limites de detecção da técnica analítica (LC-MS-MS) foram de ordem de grandeza semelhante para todos os compostos avaliados, independentemente de sua potência.

Figura 8. Curva dose-resposta para o composto E2 em termos de porcentagem da resposta máxima em diferentes concentrações de composto testado pelo método Lesk.

Figura 9. Curva dose-resposta para o composto E2 em termos de porcentagem da resposta máxima em diferentes concentrações de composto testado pelo método San.

A CE_{50} média do E2 no método Lesk foi de $6,28 \times 10^{-10}$ mol/L (171ng/L), para o método San foi de $4,41 \times 10^{-10}$ mol/L (120ng/L). Considerando os valores de LD e CE_{50} para os dois métodos, o método San foi mais sensível detectando menores concentrações de E2.

Na pesquisa de Sanseverino et al. (2009), o CE_{50} foi de $6,3 \times 10^{-10}$ M, valor muito próximo aos obtidos neste trabalho. Para a linhagem Er α desenvolvida por Leskinen et al. (2005), os pesquisadores não expressaram CE_{50} , o que impossibilitou comparações com este método nesta base.

4.2 Outras Substâncias Avaliadas

A CE_{50} e potência relativa ao E2 (TEQ) de cada composto estrogênico puro estão expressas na tabela 8. As curvas obtidas para o método Lesk mostram que a maior potência relativa foi do composto EE2 com TEQ $0,14 \times 10^{-1}$; seguido pelo E2 com TEQ 1; DES com TEQ $5,7 \times 10^{-1}$; E1 com TEQ $1,1 \times 10^{-1}$ e como estrogênio mais fraco o E3 com TEQ $1,6 \times 10^{-3}$ (Figura 10).

Figura 10. Curvas de resposta para ensaio através do método Lesk para as substâncias puras E2, EE2, E1, DES e E3. Os resultados são expressos em termos da resposta máxima de E2 versus log da concentração molar dos compostos.

As curvas dose-resposta obtidas pelo método San indicam que o composto com maior atividade estrogênica também foi o EE2 com potência relativa (TEQ) de $0,79 \times 10^{+1}$; seguido do E2 com TEQ 1, E1 com TEQ $1,98 \times 10^{-1}$; e BPA com TEQ 46×10^{-7} , (Figura 11).

Figura 11. Curvas de resposta para ensaio através do método San para as substâncias puras E2, EE2, E1, DES e E3. Os resultados são expressos em termos da resposta máxima de E2 versus log da concentração molar dos compostos.

Os dados triados na literatura referentes à CE_{50} e potência estrogênica de compostos químicos puros quando submetidos a bioensaios com leveduras em comparação aos obtidos neste trabalho com base na aplicação do método San e Lesk estão listados na tabela 8 como base para comparações.

Tabela 8. Valores de CE₅₀ e potências relativas (TEQ) obtidos nesta pesquisa comparados com dados da literatura

Composto	Trabalho/Linhagem	Atividade estrogênica	Potência Relativa
		CE ₅₀ (M)	TEQ
17β –estradiol (E2)	Método San	4,41 x 10 ⁻¹⁰	1
	Método Lesk	6,28 x 10 ⁻¹⁰	1
	Sanseverino et al. (2009)	6,3 x 10 ⁻¹⁰	1
	Leskinen et al. (2005)	-	1
	Aerni et al. (2004)	-	1
Dietilstilbestrol (DES)	Método San	-	-
	Método Lesk	1,1 x 10 ⁻⁹	5,7 x 10 ⁻¹
	Sanseverino et al.(2009)	6,42 x 10 ⁻¹⁰	9,81 x 10 ⁻¹
	Leskinen et al. (2005)	-	-
	Gaido et al. (2001)	3,5 x 10 ⁻¹⁰	6 x 10 ⁻¹
Estrona (E1)	Método San	2,23 x 10 ⁻⁹	1,98 x 10 ⁻¹
	Método Lesk	5,66 x 10 ⁻⁹	1,1 x 10 ⁻¹
	Sanseverino et al.(2009)	6,4 x 10 ⁻⁹	0,98 x 10 ⁻¹
	Leskinen et al. (2005)	-	-
	Aerni et al. (2004)	-	3,8 x 10 ⁻¹
17α-etinilestradiol (EE2)	Método San	5,57 x 10 ⁻¹¹	0,79 x 10 ⁺¹
	Método Lesk	8,9 x 10 ⁻¹⁰	0,14 x 10 ⁺¹
	Sanseverino et al. (2009)	2,5 x 10 ⁻¹¹	2,52 x 10 ⁺¹
	Leskinen et al. (2005)	-	-
	Aerni et al. (2004)	-	0,12 x 10 ⁺¹
Bisfenol A (BPA)	Método San	9,5 x 10 ⁻⁵	46 x 10 ⁻⁷
	Método Lesk	-	-
	Sanseverino et al..(2009)	6,2 x 10 ⁻⁴	6,2 x 10 ⁻⁷
	Leskienen et al. 2005)	-	4 x 10 ⁻⁵
	Gaido et al.. (2001)	3,4 x 10 ⁻⁶	6,5 x 10 ⁻⁵
Estriol (E3)	Método San	-	-
	Método Lesk	2,7 x 10 ⁻⁷	1,6 x 10 ⁻³
	Sanseverino et al. (2009)	-	-
	Leskinen et al. (2005)	-	-
	Aerni et al. (2004)	-	2,4 x 10 ⁻³
	Gaido et al.. (2001)	0,6 x 10 ⁻⁷	3,6 x 10 ⁻³

(-) Não estudados pelos autores, resultados inconclusivos ou não publicados

CE₅₀: metade da resposta máxima

TEQ: potência relativa dos compostos em relação ao E2

Verifica-se que em todos os estudos (Tabela 8), o EE2 é o composto mais potente, sendo maior sua potência para o método San que para o método Lesk. Esta potência é em torno de 1,2 a 25 vezes maior que do composto referência E2. Salste et al. (2007) avaliaram a potência do EE2 com o bioensaio Lesk, adotando uma potência relativa 1, sendo, portanto, igual à potência de E2. Observa-se que o ensaio San com a levedura luminescente desenvolvida por Sanseverino et al. (2005) é mais sensível ao composto EE2 que o ensaio Lesk e que o ensaio YES.

O DES foi o segundo composto mais potente para todos os métodos, porém sua potência é menor que para o E2 de acordo com o método Lesk, 0,57 vezes menos potente que E2 semelhante ao encontrado por Gaido et al. (2001), e também apresentou menores resultados quando comparado aos dados de Sanseverino et al. (2009), que encontraram potência relativa a E2 de 0,98. Nesse caso, o método San foi mais sensível ao DES que o Lesk e que o ensaio YES.

O composto E1 apresentou atividade estrogênica semelhante entre os métodos empregados neste trabalho e Sanseverino et al. (2009), sendo de 10 a 20 vezes menos potente que o E2. Para Aerni et al. (2004) com ensaio YES, a potência do E1 foi de 0,38 em relação ao E2, sendo mais potente que os valores observados com os métodos empregados nesta pesquisa. Para Murk et al. (2002) com o ensaio YES a potência encontrada para E1 foi de 0,01 em relação à potência relativa de E2. Além da variação na sensibilidade e resposta ao composto E1 entre os diferentes métodos utilizados, há também variabilidade considerável entre os diferentes trabalhos que se utilizam de um mesmo método, porém, qualitativamente, o composto para todos os métodos é menos potente que EE2, E2 e DES.

O BPA apresentou potência menor que todos os compostos testados, sendo da ordem de 6×10^{-7} à 42×10^{-7} vezes menos potente que E2 em termos de resposta estrogênica para as leveduras. Leskinen et al. (2005), empregando o método Lesk, encontraram potência de BPA de 4×10^{-5} , sendo semelhante à obtida no ensaio YES (potência $6,5 \times 10^{-5}$ para BPA). As diferenças nos resultados encontrados na presente pesquisa para o método San e por Sanseverino et al. (2009) utilizando o mesmo método se devem, provavelmente, às diferenças entre as linhagens de leveduras cultivadas em ambientes distintos. Murk et al. (2002), empregando ensaio YES, observaram potência para BPA de 10^{-5} em relação ao E2, evidenciando que o ensaio YES e o Lesk podem ser mais sensíveis a este composto que o ensaio San.

O E3 foi testado através do método Lesk, mas não foram encontrados valores de potência e CE_{50} para este composto na literatura com as linhagens empregadas neste trabalho, sendo este o primeiro registro. A substância apresentou potência em torno de $1,6 \times 10^{-3}$ quando comparado ao composto E2 com uso do método Lesk. Aerni et al. (2004) com ensaio YES encontraram potência relativa para E3 de $2,4 \times 10^{-3}$, enquanto Gaido et al. (2001) encontraram potência de $3,6 \times 10^{-3}$. Tais resultados indicam que a potência relativa para E3 verificada neste trabalho com o método Lesk é comparável a resultados com as outras linhagens de levedura.

De acordo com as potências relativas obtidas para o método San e o método Lesk neste trabalho e os dados da literatura, observa-se que, em escala decrescente de potência, o composto EE2 é o mais potente, seguido pelo E2, DES, E1, E3 e por último o BPA com potência relativa menor que os outros compostos.

Murk et al. (2002) também avaliaram a potência relativa do composto nNP encontrando TEQ de $5,7 \times 10^{-4}$ em relação ao E2 e TEQ de 10^{-5} para o composto

nOP através de bioensaios com leveduras. A atividade estrogênica gerada por eles é menor que a do E2 e maior somente que a potência de BPA. Quando considerados isoladamente, nNP e nOP, apresentam contribuição para a atividade estrogênica expressivamente menor que a dos estrogênios naturais e sintéticos.

4.3 Avaliação de Amostras Ambientais

PONTO CAMPINAS

No ponto Campinas, não foi observada atividade estrogênica nas amostras de águas tratadas submetidas aos bioensaios (Figura 12) e não foram detectados compostos estrogênicos através de análises cromatográficas. Os resultados concordantes demonstram que é pouco provável que haja estrógenos nestas águas.

Figura 12. Curvas dose-resposta em termos de porcentagem da resposta máxima obtida para E2 versus o log dos fatores de concentração dos extratos de amostra com emprego do método Lesk e San para amostras de águas tratadas de Campinas, coletadas em abril (Lesk-abril e San-abril) e junho (Lesk-junho e San-junho) de 2009.

Para amostra de água bruta do ponto Campinas foi detectada baixa atividade estrogênica, de 0,13 ng equiv. E2/L pelo método San, e não foi detectada atividade estrogênica no bioensaio Lesk (Figura 13). O resultado corrobora aquele obtido para substâncias puras, para as quais a linhagem utilizada no ensaio Lesk foi menos sensível que a linhagem BLYES em San.

Figura 13. Curvas dose-resposta em termos de porcentagem da resposta máxima obtida para E2 versus o log dos fatores de concentração do extrato de amostra com emprego do método Lesk e San para amostra de água bruta do ponto Campinas coletada em junho de 2009.

Por meio das análises cromatográficas, detectou-se 1,48ng/L de E3 (TEQ $1,6 \times 10^{-3}$), 1,24ng/L de nNP (TEQ $5,7 \times 10^{-4}$) e 1,96ng/L de nOP (TEQ 10^{-5}). A atividade estrogênica calculada (esperada), resultante da combinação desses compostos em concentrações nas quais foram encontrados no ambiente conforme sua potência estrogênica foi menor que o LD (0,09 ng equiv. E2/L), não quantificável. Os compostos estrogênicos encontrados apresentam baixa potência

quando comparados ao E2, mesmo considerando a possibilidade de aditividade de efeito entre eles (AERNI et al., 2004). E1 e BPA foram também identificados nesta amostra, porém não foram quantificados por estarem abaixo dos limites de detecção do método analítico. No trabalho de Céspedes et al. (2004), os bioensaios com leveduras foram mais sensíveis a hormônios naturais e sintéticos e menos a nonilfenol e nonilfenol etoxilatos, desse modo, é presumível que a atividade estrogênica para a amostra de Campinas tenha grande contribuição dos compostos E3, mais potente nas células que nNP e nOP. Ainda que abaixo dos limites de detecção, não se pode descartar a hipótese de que as substâncias identificadas, mas não quantificadas na amostra pela concentração baixa, tenham contribuído para resultar em resposta biológica positiva através do método San.

As águas brutas de Campinas, no Rio Atibaia, foram classificadas como péssimas em relatório da CETESB (2008), devido ao elevado potencial de formação de trihalometanos e pouca biodiversidade. A região também apresentou concentrações de Chumbo e Mercúrio acima dos limites estabelecidos pela legislação CONAMA 357/2005. Com relação à presença de metais, o cromo esteve acima dos valores aceitáveis. Os teores de coliformes termotolerantes ficaram acima dos permitidos, variando entre 23000 e 170000 UFC/100mL, sendo o máximo permitido de 1000 UFC/100mL, indicando que a presença dos compostos estrogênicos pode ser tanto proveniente dos esgotos domésticos quanto industriais (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, CETESB, 2008).

PONTO ATIBAIA

No ponto Atibaia não foi detectada atividade estrogênica em águas tratadas o que corrobora com a não detecção de compostos estrogênicos por análises cromatográficas (Figura 14).

Figura 14. Curvas dose-resposta em termos de porcentagem da resposta máxima obtida para E2 versus o log dos fatores de concentração dos extratos de amostra com emprego do método Lesk e San para amostras de águas tratadas coletadas em abril (Lesk-abril e San-abril) e junho (Lesk-junho e San-junho) de 2009 em Atibaia.

A água bruta do ponto Atibaia não apresentou atividade estrogênica nos dois bioensaios (Figura 15), no entanto, foram verificados 2,76ng/L de BPA. A atividade estrogênica esperada (BPA, TEQ 46×10^{-7}) não foi quantificada pois estaria abaixo do LD do método biológico, conforme definido a partir do E2. O composto puro BPA tem potência estrogênica baixa, sendo necessária grande concentração em relação aos demais para gerar resposta biológica relacionada ao receptor de estrógeno e possibilitar quantificação de resposta esperada. Nessa amostra é provável que o

BPA era o único poluente estrogênico, sem a presença de fatores que aumentem sua estrogenicidade.

Figura 15. Curvas dose-resposta em termos de porcentagem da resposta máxima obtida para E2 versus o log dos fatores de concentração do extrato de amostra com emprego do método Lesk e San para amostra de água bruta no ponto Atibaia, coletada em junho de 2009.

Em 2007 a CETESB classificou a água dessa região como regular para fins de abastecimento, já em 2008 houve grande variação mensal da qualidade da água, tendo sido qualificada como péssima em janeiro, porém boa na média do ano, variando conforme as estações chuvosas e secas. Alguns parâmetros avaliados estiveram em desacordo com a legislação CONAMA 357 de 2005. O teor de oxigênio dissolvido e fósforo total não atenderam essa legislação na maior parte das campanhas de coleta, assim como os teores de ferro dissolvido (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 2008). Essas características indicam ocorrência de poluição associada a esgotos domésticos.

PONTO GUARULHOS

Nas amostras do ponto Guarulhos, não foi detectada atividade estrogênica nas águas tratadas (Figura 16), nem nas águas brutas do Reservatório Tanque Grande (Figura 17). Não houve detecção também de compostos estrogênicos através de análises cromatográficas. Isto indica que pode não haver compostos estrogênicos nesta região ou que suas concentrações são muito baixas. Tais resultados também corroboram com avaliações feitas pela CETESB, que indicam boa qualidade da água para fins de abastecimento no reservatório e ainda todos os parâmetros de qualidade da água avaliados estiveram de acordo com a regulamentação vigente para 2008 (CETESB, 2008).

Figura 16. Curvas dose-resposta em termos de porcentagem da resposta máxima obtida para E2 versus o log dos fatores de concentração dos extratos de amostra com emprego do método Lesk e San para amostras de águas tratadas coletadas em abril (Lesk-abril e San-abril) e junho (Lesk-junho e San-junho) de 2009, em Guarulhos.

Figura 17. Curvas dose-resposta em termos de porcentagem da resposta máxima obtida para E2 versus o log dos fatores de concentração do extrato de amostra com emprego do método Lesk e San para amostra de água bruta no ponto Guarulhos, coletada em junho de 2009.

PONTO BARUERI

Nas amostras do ponto Barueri foi detectada atividade estrogênica de 0,2 ng equiv. de E2/L por meio do método San para a água tratada coletada em abril de 2009, no entanto, apesar de ter sido verificado aumento das respostas nos ensaios pelo método Lesk, os valores para atividade estrogênica estiveram abaixo do LD do método. As análises biológicas e cromatográficas foram repetidas para a amostra. No ensaio San os resultados foram sempre positivos, já no Lesk sempre não quantificáveis. Nas repetições das análises cromatográficas, somente em uma foi detectado o composto E2 em baixas concentrações, tornando os resultados inconclusivos. O bioensaio indica que este ponto deve ser priorizado e monitorado posteriormente quanto à presença de compostos-alvo, considerando também que as águas brutas da região foram as que apresentaram menor qualidade. Mais uma vez,

o método Lesk gerou respostas estrogênicas menores que o método San. Para amostra de água tratada coletada em junho de 2009 não foi detectada atividade estrogênica para nenhum dos bioensaios e nem compostos estrogênicos nas análises cromatográficas (Figura 18).

Figura 18. Curvas dose-resposta em termos de porcentagem da resposta máxima obtida para E2 versus o log dos fatores de concentração dos extratos de amostra com emprego do método Lesk e San para amostras de águas tratadas de Barueri, coletadas em abril (Lesk-abril e San-abril) e junho (Lesk-junho e San-junho) de 2009.

Para amostra de água bruta do ponto de Barueri, no Rio Cotia, foi detectada atividade estrogênica de 3,1 ng equiv. E2/L pelo método San e 1,6 ng equiv. E2/L pelo método Lesk (Figura 19). Para o ensaio San a primeira amostra positiva teve fator de concentração 10, considerado baixo em relação às demais amostras, enquanto que no ensaio Lesk a atividade só foi detectada em fator de concentração 100. A resposta máxima para essa amostra no método Lesk atingiu 18% da resposta máxima e o método San atingiu 36% na atividade estrogênica máxima observada.

Através de análises cromatográficas foram identificados 7,7 ng/L de E3, 11,4 ng/l BPA para essa amostra do rio Cotia, este último de maior potência que o

primeiro. Não foi detectado E2, embora tenha havido indícios de que estava na água tratada da região em abril. A atividade estrogênica esperada equivalente a E2 não foi quantificável por estar abaixo de LD, desta forma, o tipo e teor de contaminantes detectado não explica o efeito observado no bioensaio.

A região desse ponto foi considerada de qualidade péssima pela CETESB, com presença de coliformes termotolerantes e toxicidade em 2008. Nesse ponto, as elevadas concentrações de Fósforo Total têm como origem os esgotos domésticos associados à presença dos estrógenos, o que é indicado também pelos valores de Coliformes Termotolerantes entre 7.100 e 550.000 UFC/100mL, acima do limite (4000 UFC/100mL) estabelecido pela Resolução CONAMA 357/05 para a classe 3 do corpo d'água. Em corpos d'água desta classe é permitida a descarga de efluentes desde que devidamente tratados, mas sua devida desinfecção e remoção de micropoluentes pode não estar ocorrendo.

Figura 19. Curvas dose-resposta em termos de porcentagem da resposta máxima obtida para E2 versus o log dos fatores de concentração do extrato de amostra com emprego do método Lesk e San para amostra de água bruta no ponto Barueri coletada em junho de 2009.

PONTO CERQUILHO

No ponto cerquilho, não foi detectada atividade estrogênica nos bioensaios para as águas tratadas em nenhum período avaliado (Figura 20) e não foram verificados compostos estrogênicos. Assim, as análises químicas e biológicas estão coerentes.

Figura 20. Curvas dose-resposta em termos de porcentagem da resposta máxima obtida para E2 versus o log dos fatores de concentração dos extratos de amostra com emprego do método Lesk e San para amostras de águas tratadas coletadas em abril (Lesk-abril e San-abril) e junho (Lesk-junho e San-junho) de 2009 em Cerquilho.

Para as águas brutas de Cerquilho, situadas no Rio Sorocaba, foi detectada atividade estrogênica de 0,7 ng equiv. E2/L e 0,4 ng equiv. E2/L para os métodos San e Lesk, respectivamente (Figura 21). A atividade estrogênica é comparável para os dois métodos, ainda que o método San tenha se mostrado mais sensível que o método Lesk. Foram encontradas 3,53 ng/L BPA, no entanto, a atividade estrogênica esperada não foi detectável. A TEQ de BPA foi maior no método San do

que Lesk, no entanto, somente o teor de composto BPA encontrado por análises químicas não explica a atividade estrogênica observada nos métodos biológicos, sendo necessária uma quantidade muito alta desta substância para gerar as respostas biológicas observadas, o que não ocorreu.

Figura 21. Curvas dose-resposta em termos de porcentagem da resposta máxima obtida para E2 versus o log dos fatores de concentração do extrato de amostra com emprego do método Lesk e San para amostra de água bruta no ponto Cerquilho, coletada em junho de 2009.

O ponto localizado à montante da captação de água para abastecimento público do Município de Cerquilho apresentou IAP anual regular em 2008 na categoria, sendo que a qualidade da água estava péssima em janeiro e ruim em novembro pelo elevado potencial de formação de trihalometanos. A quantidade de coliformes termotolerantes ficou abaixo do valor máximo permitido e não houve toxicidade crônica para organismos aquáticos (*C.dubia*). Fósforo total, fluoreto e manganês apresentaram valores maiores que os permitidos pela resolução CONAMA 357/05 na maioria das amostras, mais uma vez a poluição por IE está

associada à presença de outros contaminantes em concentrações maiores que as permitidas (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 2008).

EFLUENTE HOSPITALAR

Para o Efluente Hospitalar foi detectada atividade estrogênica de 22,9 ng equiv. E2/L no método San, 13,7 ng equiv. E2/L através do método Lesk (Figura 22). A atividade estrogênica esperada seria de 0,3 ng equiv. E2/L com base na detecção de 182 ng/L de E3, nenhum outro composto estrogênico-alvo foi encontrado. O método San detectou como positivas concentrações dez vezes menores que o método Lesk, sendo também mais sensível para esta amostra. É provável que haja outros compostos estrogênicos nesta amostra complexa e que não foram avaliados por cromatografia. Efeitos causados por compostos não incluídos na abordagem analítica, sinergismo entre substâncias ou presença de subprodutos são pontos a serem levados em conta em monitoramento deste tipo de matriz.

Figura 22. Curvas dose-resposta em termos de porcentagem da resposta máxima obtida para E2 versus o log dos fatores de concentração dos extratos de amostra com emprego do método Lesk e San para efluente hospitalar coletado em junho de 2009.

Na tabela 9 foram inseridos de forma resumida os dados obtidos para avaliação biológica de todas as amostras de água tratada, bruta e efluente avaliadas nesta pesquisa, contendo também as concentrações e tipos de compostos provenientes das análises cromatográficas realizadas em paralelo.

Tabela 9. Resultados de análises cromatográficas de compostos-alvo detectados; valores calculados em termos de equivalentes de E2 a partir da potência relativa dos compostos estrogênicos detectados; e atividade estrogênica pelo método San e Lesk em termos de equivalentes de E2, para as amostras de água tratada e bruta, e efluente hospitalar estudados.

Amostra	Data da coleta	Composto detectado por análises cromatográficas*	Resposta Esperada em ng equivalentes de E2/L com base nas análises Cromatográficas*	Atividade Estrogênica pelo Método San (ng equivalentes E2 /L)	Atividade Estrogênica pelo Método Lesk (ng equivalentes E2/L)
Campinas – água tratada	Abril	ND	ND	ND	ND
Campinas – água tratada	Junho	ND	ND	ND	ND
		E3 – 1,48 ng/L			
Campinas – água bruta	Junho	nNp – 1,24 ng/L nOP – 1,96 ng/L	ND	0,13	ND
Atibaia – água tratada	Abril	ND	ND	ND	ND
Atibaia – água tratada	Junho	ND	ND	ND	ND
Atibaia – água bruta	Junho	BPA - 2,76 ng/L	ND	ND	ND
Guarulhos – água tratada	Abril	ND	ND	ND	ND
Guarulhos – água tratada	Junho	ND	ND	ND	ND
Guarulhos – água bruta	Junho	ND	ND	ND	ND
Barueri – água tratada	Abril	E2 – 0,36 ng/L	ND	0,2	ND
Barueri – água tratada	Junho	ND	ND	ND	ND
		E3 - 7,7 ng/L			
Barueri – água bruta	Junho	BPA – 11, 4 ng/L	ND	3,1	1,6
Cerquilha água tratada	Abril	ND	ND	ND	ND
Cerquilha – água tratada	Junho	ND	ND	ND	ND
Cerquilha – água bruta	Junho	BPA – 3,53 ng/L	ND	0,7	0,4
Efluente Hospitalar	Junho	E3 - 182 ng/L	0,3	22,9	13,7

Legenda:

*Respostas de atividade estrogênica de calculadas de acordo com resultados das análises Cromatográficas realizadas pelo Lab. De Química Ambiental da UNICAMP.

ND: não detectado

nNp – 4-n-nonilfenol com TEQ $5,7 \times 10^{-4}$; nOP – 4-n-octilfenol com TEQ 10^{-5} (MURK *et al.*; 2002); BPA – bisfenol A, com TEQ 46×10^{-7} ; E3 – Estriol, com TEQ $1,6 \times 10^{-3}$.

De maneira geral, não foram detectados compostos estrogênicos nas amostras de água tratada, há poucos trabalhos na literatura cujo foco seja análise de estrógenos em águas tratadas e seus efeitos, bem como poucos resultados, não tendo sido possível estabelecer comparações com outros países em que haja legislação que regulamente este grupo de substâncias. Os bioensaios também foram

negativos em termos de atividade estrogênica para estas águas, com apenas uma exceção. A atividade estrogênica na água tratada de Barueri em abril pelo método San, pode ser devido à presença do composto E2 ou ainda por mistura de diferentes compostos abaixo do limite de detecção da técnica cromatográfica. As amostras de água bruta de Barueri foram as que apresentaram os mais altos níveis de compostos estrogênicos e resposta biológica, o que poderia explicar a presença de tais compostos na água tratada proveniente deste manancial, sendo recomendável verificação da eficiência de tratamento na ETA da região. O ponto deve ser priorizado em monitoramento subsequente de longo prazo para que resultados conclusivos sejam alcançados.

Nas amostras de água bruta, cinco dos compostos avaliados por análises cromatográficas estiveram presentes, estes resultados são coerentes com os encontrados na região de Campinas por Sodré et al. (2007), que verificaram a presença de xenobióticos em 80% das amostras dos mananciais da região. Em todas as situações, o bisfenol A (BPA) foi o mais frequentemente encontrado e em mais altas concentrações. Essa substância pode ser empregada por indústrias na produção de PVC, resinas epóxi e na produção térmica de papel. O composto é extremamente estável, pode atingir os corpos d'água como resultado da produção, quando utilizado como reagente, e da lixiviação de produtos manufaturados.

Outras possíveis fontes de compostos estrogênicos detectados são os esgotos domésticos, tratados ou não, lançados nos corpos d'água da região de coleta, uma vez que a excreção de hormônios naturais E1, E2 e E3 por homens em pequena quantidade e em maior quantidade pelas mulheres é um fator considerado relevante na literatura (LEE; PEART, 1998). Uma gama diversa de substâncias não

foi avaliada por cromatografia e pode ser considerada em monitoramento posterior. Além do BPA, esgotos industriais podem conter surfactantes, hidrocarbonetos poliaromáticos e pesticidas (BIRKETT; LESTER, 2003). Compostos estrogênicos nas águas brutas do estado de São Paulo podem ainda advir de pesticidas utilizados na agricultura com formulações com nonilfenol polietoxilatos e que são quebrados a nonilfenol (NP) após aplicação (ROUTLEDGE; SUMPTER, 1996).

Houve coerência entre a atividade estrogênica medida em bioensaios e esperada em termos de tendências, porém, no geral, os valores de atividade calculada com base nas concentrações de cada composto encontrado via análises químicas tendem a subestimar as respostas biológicas *in vitro* e, segundo MURK et al., 2002 e AERNI et al., 2004, *in vivo*. A presença de isômeros dos alquilfenóis indistinguíveis por cromatografia, mas que apresentam atividade estrogênica é outro fator que esclarece este fenômeno (CÉSPEDES et al; 2004). Xenoestrogênios, mesmo quando detectados em concentrações em que isoladamente não causam efeitos podem gerar atividade estrogênica quando combinados (DESBROW et al., 1998; BRIAN et al., 2005; NELSON et al., 2007). Há estudos em que os compostos BPA, nonilfenol, E2 e EE2 causaram efeitos sinérgicos quando combinados abaixo das quantidades que gerariam efeitos se estivessem isolados, porém em outros ocorreu somente efeito aditivo. Essas controvérsias devem ser melhor estudadas para que se tire conclusões acuradas acerca da aditividade e sinergismo entre substâncias na origem de efeitos (SILVA et al., 2002; CHEN et al., 2007).

Para águas superficiais os valores de atividade estrogênica nos testes com as leveduras recombinantes variaram de não detectáveis à 7,4 ng equiv. E2/L (Tabela 9). Em outros países em que foi feito este tipo de estudo, houve igualmente

atividade estrogênica nos corpos d'água urbanos e em muitos casos esta não foi explicada com base nos resultados de análises químicas. As respostas biológicas nas amostras de água superficial positivas em Campinas, Barueri, Cerquilha foram comparáveis à atividade estrogênica observada em rios do Reino Unido, Holanda, Alemanha, Suíça, Portugal, Espanha e China (Figura 23). Nos artigos científicos encontrados, para os rios dos referidos países foram identificados E1, E2, E3, EE2, NP, OP e BPA, que também foram alvos neste estudo, mas também 17 α -estradiol, NPEO1, NPEO2, DEP, DEHP, DBP, os quais não foram substâncias-alvo da cromatografia. Tais substâncias foram abundantes em ambientes contaminados por esgotos e poderiam ser incluídas na lista de compostos-alvo para monitoramento ulterior das águas nos pontos em que a atividade estrogênica não encontra explicação nos resultados químicos que obtivemos.

Figura 23. Valores máximos de atividade estrogênica em equivalentes de E2 através de bioensaios com leveduras recombinantes para águas superficiais de diversos países e nessa pesquisa. (1) CÉSPEDES et al.; 2005; (2) VERMEIRSEN et al.; 2005; (3) MA et al.; 2007; (4) CÉSPEDES et al.; 2004; (5) FAWELL et al.; 2001; (6) PAWLOWSKI et al.; 2003; (7) MURK et al.; 2002.

Para efluentes tratados, os valores de atividade estrogênica encontrados por outros autores variam entre não detectáveis e 1400 ng equiv. E2/L e efluentes não tratados de não detectáveis a 120 ng equiv. E2/L. No presente trabalho foram encontradas 13,7 ng equiv. E2/L e 22,9 ng equiv. E2/L para efluente hospitalar de acordo com o método Lesk e San, respectivamente, o que está dentro das faixas de efeitos encontradas para efluentes de outras regiões. Nesse caso, a atividade estrogênica não foi explicada integralmente pelas análises químicas, tendo sido encontrado unicamente o composto E3. No geral, os trabalhos recentes da literatura demonstram que há grande diversidade de contaminantes emergentes não conhecidos em efluentes hospitalares. ORT et al. (2010) encontraram os antibióticos e roxitromicina, trimetoprim e triclosan que pode causar problemas no desenvolvimento do feto; o repelente DEET, reconhecido IE; entre outras substâncias que influenciam nos efeitos estrogênicos destas. Em outras localidades foram detectados estrogênios naturais e sintéticos, xenoestrogênios e fitoestrogênios, sendo do mesmo modo possível a presença de alguns desses compostos no efluente analisado (MURK et al.; 2002, PAWLOWSKI et al.; 2003, HUGGETT et al.; 2003, AERNI al.; 2004, CÉSPEDES et al.; 2005; NELSON et al.; 2007; MA et al.; 2007). Há relatos de que o tratamento do efluente gerou aumento ao invés de redução de atividade estrogênica em efluente final, o que pode explicar os valores mais altos encontrados para os efluentes tratados. Esse fator deve ser considerado ao medir a contribuição de efluentes para a descarga de IE nas águas. A comparação com a atividade estrogênica medida para efluentes de outros países fica, no entanto, comprometida pelo fato de que dependendo do tipo de esgoto

estarão presentes diferentes compostos e poucos efluentes hospitalares são abordados em outros trabalhos. Ademais, a vasta gama de poluentes nestas amostras confere alta toxicidade, o que pode inviabilizar a obtenção de curvas dose-resposta completas em testes de estrogenicidade.

Quanto à validade dos bioensaios e sua representatividade, Murk et al. (2002) indicam que atividade estrogênica avaliada pelos bioensaios *in vitro* está de acordo com a intensidade dos efeitos observados *in vivo* em ensaios em peixes. A menor atividade estrogênica associada a efeitos adversos relacionados à produção de vitelogenina em peixes é de 0,3 ng equiv. E2/L em trutas imaturas (*Oncorhynchus mykiss*) depois de tempo prolongado de exposição e 10 ng equiv. E2/L podem estar associados a efeitos adversos em trutas macho em períodos menores de exposição. Jobling et al. (1996) reportaram que 2 ng equiv. E2/L por três semanas de exposição podem causar produção de vitelogenina e crescimento do testículo em trutas macho em fase de maturação. Desse modo, a atividade estrogênica verificada para águas brutas de Cerquilho e de Barueri estão próximas aos valores associados a efeitos adversos verificados nos experimentos *in vivo* mencionados. No geral, IE podem não apresentar efeitos agudos nos organismos aquáticos, mas podem afetar o desenvolvimento pela contínua introdução no ambiente. Assim, a avaliação das consequências para a biota é delongada, o que justificou o emprego de bioensaios com leveduras para avaliar em curto prazo e em programas de monitoramento sua presença e magnitude no ambiente (ISIDORI et al., 2009). Para as águas estudadas nessa pesquisa é necessário que investigações posteriores sejam feitas no sentido de verificar se a presença dos IE detectados estão ou não causando danos aos animais e à população possivelmente exposta.

A atividade estrogênica verificada por bioensaios com leveduras e os resultados de determinações analíticas nesta pesquisa comprovam que, de fato, o bioensaio é aplicável na avaliação das amostras complexas, útil para tomada de decisões e auxiliar na avaliação de possíveis efeitos adversos. Em todas as amostras em que foi detectado composto estrogênico por análises cromatográficas os ensaios tiveram resultados positivos e, no geral, nas amostras em que não foi detectado composto estrogênico os bioensaios resultaram em atividade estrogênica não detectável.

O monitoramento para avaliação do perigo baseado em efeitos biológicos em combinação às análises químicas mostra ser mais apropriado do que a utilização de somente uma das abordagens, o que releva o emprego dos métodos utilizados nesta pesquisa para tal fim. Ainda que não se possa substituir a avaliação de amostras através de análises químicas pela biológica, já que estas se complementam, os bioensaios podem ser utilizados por autoridades na regulação e por indústrias para prover informações para testes de rotina de suas amostras. Os bioensaios proveram rapidez para obtenção de resultados e baixos custos no monitoramento de grande número de amostras, resultando em indicação preliminar da presença de interferentes endócrinos estrogênicos (RODRIGUEZ-MOZAZ et al., 2007).

Por fim, a interação com o sistema endócrino através de ativação de resposta via ligação com receptor de estrógeno representa mecanismo de possível efeito, mas não pode ser considerado efeito adverso por si só (GELBKE, 2004). Estudos com as leveduras recombinantes foram capazes de detectar compostos agonistas a receptores de estrógeno, no entanto, a atividade estrogênica pode ocorrer através

de outras vias indiretas como atuação na degradação ou síntese de E2 no organismo e outras biotransformações. Todos estes compostos não foram avaliados através dos bioensaios com as leveduras luminescentes, mas ainda assim, podem causar atividade estrogênica em ensaios *in vivo*, dessa maneira tais ensaios são necessários em paralelo a ensaios *in vitro* quando o objetivo é avaliar efeitos de compostos que podem ser androgênicos, antiestrogênicos e anti-androgênicos (PAWLOWSKI et al., 2003).

A Comissão da Comunidades Européia (2004), na implementação de estratégias para disruptores endócrinos, também aponta para a importância de experimentos do tipo bioensaios com amostras ambientais ao concluir que *“para compostos com modos de ação idênticos, como hormônios estrogênicos e xenoestrogênios que agem a partir da ligação com receptores de estrógeno, a avaliação de risco baseada nos compostos considerados isoladamente é problemática. Por exemplo, efeitos de estrógenos naturais e sintéticos podem ser aditivos, principalmente porque esses químicos ocorrem simultaneamente nas águas”*.

Os dois bioensaios com leveduras luminescentes empregados para avaliação de atividade estrogênica apresentaram resultados comparáveis, no entanto, o método San mostrou-se mais sensível que o método Lesk para o grupo de substâncias e amostras ambientais analisadas neste trabalho.

Os bioensaios indicaram presença de compostos estrogênicos mesmo quando compostos-alvo não foram detectados por cromatografia (LC-MS-MS), evidenciando que outros compostos não avaliados ou interação entre substâncias podem ser responsáveis pelo efeito estrogênico observado.

As pesquisas publicadas na literatura científica em outros países demonstraram fontes de poluição por IE, tipos de contaminantes e atividade estrogênica comparáveis a esta pesquisa feita no estado de São Paulo, e são fonte importante para nortear a seleção de substâncias que representam risco nos corpos d'água estudados e que porventura não tenham sido incluídas aqui.

Os bioensaios são aplicáveis para o monitoramento de grande quantidade de amostras ambientais, para priorizar áreas críticas quanto à necessidade de investigação de compostos estrogênicos e seus possíveis efeitos adversos, com custo relativamente baixo.

É necessária continuidade da avaliação de qualidade dos mananciais estudados, sendo o monitoramento dos mesmos acompanhado de bioensaios e/ou abordagens que incluam integração de resultados analíticos com avaliação de efeito,

cujos resultados permitirão a gestão adequada e eventual prevenção da contaminação por interferentes endócrinos das águas tratadas.

- AERNI, H. R.; KOBLE, B.; RUTISHAUSER, B. V.; WETTSTEIN, F. E.; FISCHER, R.; GIGER, W.; HUNGERBÜHLER, A.; MARAZUELA, M. D.; PETER, A.; SCHÖNENBERGER, R.; VÖGELI, A. C.; SUTER, M. J.; EGGEN, R. I. Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 378, n. 3, p. 688-696, 2004.
- ANDERSON, M. J.; OLSEN, H.; MATSUMURA, F.; HINTON, D. E. In vivo modulation of 17 beta-estradiol-induced vitellogenin synthesis and estrogen receptor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells by beta-naphthoflavone. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 137, n. 2, p. 210-218. 1996.
- BALSIGER, H. A.; TORRE, L.; LEE, W.; COX, M. B. A four-hour yeast bioassay for the direct measure of estrogenic activity in wastewater without sample extraction, concentration or sterilization. **Science of the Total environment**, Amsterdam, v. 408, n. 6, p.1422-1429, 2010.
- BARONTI, C.; CURINI, R.; D'ASCENZO, G.; DI CORCIA, A.; GENTILI, A.; SAMPERI, R. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 34, n. 24, p. 5059-5066, 2000.
- BECK, I. C.; BRUHN, R.; GANDRASS, J. Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen. **Chemosphere**, Oxford, v. 63, n. 11, p. 1870-1878, 2006.
- BELFROID, A. C.; VAN DER HORST, A.; VETHAAK, A. D.; SCHAFER, A. J.; RIJS, G. B.; WEGENER, J.; COFINO, W. P. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 225, n. 1-2, p. 101-108, 1999.
- BENNIE, D. T. Review of the environmental occurrence of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates. **Water Quality Research Journal of Canada**, Ontario, v. 34, n. 1, p. 79-122, 1999.
- BERG, C.; HALLDIN, K.; FRIDOLFSSON, A.; BRANDT, I.; BRUNSTROM, B. The avian egg as a test system for endocrine disrupters: effects of diethylstilbestrol and ethynylestradiol on sex organ development. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 233, n. 1-3, p. 57-66, 1999.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.
- BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. **Endocrine disruptors in wastewater and sludge treatment processes**. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, 2003.

BODZEK, M.; DUDZIAK, M. Elimination of steroidal sex hormones by conventional water treatment and membrane processes. **Desalination**, Amsterdam, v. 198, n. 1-3, p. 24-32, 2006.

BRACK, W.; SCHMITT-JANSEN, M.; MACHALA, M.; BRIX, R.; BARCELO, D.; SCHYMANSKI, E.; STRECK, G.; SCHULZE, T. How to confirm identified toxicants in effect-directed analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 390, n. 8, p. 1959-1973, 2008.

BRENTANI, M. M.; COELHO, F. R. G.; KOWALSKI, L. P. **Bases de oncologia**. 2. ed. São Paulo: Tecmedd, 2003.

BRIAN, J. V.; HARRIS, C. A.; SCHOLZE, M.; BACKHAUS, T.; BOOY, P.; LAMOREE, M.; POJANA, G.; JONKERS, N.; RUNNALLS, T.; BONFA, A.; MARCOMINI, A.; SUMPTER, J. P. Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 113, n. 6, p. 721-728, 2005.

CAMPBELL, C. G.; BORGLIN, S. E.; GREEN, F. B.; GRAYSON, A.; WOZEI, E.; STRINGFELLOW, W. T. Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, n. 8, p. 1265-1280, 2006.

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

CESPEDES, R.; PETROVIC, M.; RALDUA, D.; SAURA, U.; PINA, B.; LACORTE, S.; VIANA, P.; BARCELO, D. Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 378, n. 3, p. 697-708, 2004.

CESPEDES, R.; LACORTE, S.; RALDÚA, D.; GINEBREDÀ, A.; BARCELÓ, D.; PIÑA, D.; Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat river basin (Catalonia, NE Spain). **Chemosphere**, Oxford, v. 61, p. 1710-1719, 2005.

CHEEK, A. O.; VONIER, P. M.; OBERDORSTER, E.; BUROW, B. C.; MCLACHLAN, J. A. Environmental signaling: a biological context for endocrine disruption. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 106, Suppl 1, p. 5-10, 1998.

CHEN, P. J.; ROSENFELDT, E. J.; KULLMAN, S. W.; HINTON, D. E.; LINDEN, K. G. Biological assessments of a mixture of endocrine disruptors at environmentally relevant concentrations in water following UV/H₂O₂ oxidation. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 376, n. 1-3, p. 18-26, 2007.

- COLBORN, T.; VOM SAAL, F. S.; SOTO, A. M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 101, n. 5, p. 378-384, 1993.
- COLBORN, T.; DUMANOSKI, D.; MYERS, J. P. **O futuro roubado**. Porto Alegre: L & PM, 1996.
- COLEMAN, H. M.; ABDULLAH, M. I.; EGGINS, B. R.; PALMER, F. L. Photocatalytic degradation of 17 beta-oestradiol, oestriol and 17 alpha-ethynyloestradiol in water monitored using fluorescence spectroscopy. **Applied Catalysis B-Environmental**, Amsterdam, v. 55, n. 1, p. 23-30, 2005.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (São Paulo). Secretaria do Meio Ambiente. **Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo 2008**. São Paulo, 2009. (Série relatórios, 2008). Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/publicacoes.asp>>. Acesso em: 31 jan. 2010.
- CONROY, O.; SAEZ, A. E.; QUANRUD, D.; ELA, W.; ARNOLD, R. G. Changes in estrogen/anti-estrogen activities in ponded secondary effluent. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 382, n. 2-3, p. 311-323, 2007.
- CUNNINGHAM, A. R.; KLOPMAN, G.; ROSENKRANZ, H. S. A dichotomy in the lipophilicity of natural estrogens, xenoestrogens, and phytoestrogens. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 105, Suppl 3, p. 665-668, 1997.
- D'ASCENZO, G.; DI CORCIA, A.; GENTILI, A.; MANCINI, R.; MASTROPASQUA, R.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 302, n. 1-3, p. 199-209, 2003.
- DASTON, G. P.; GOOCH, J. W.; BRESLIN, W. J.; SHUEY, D. L.; NIKIFOROV, A. I.; FICO, T. A.; GORSUCH, J. W. Environmental estrogens and reproductive health: a discussion of the human and environmental data. **Reproductive Toxicology**, Elmsford, v. 11, n. 4, p. 465-481, 1997.
- DESBROW, C.; ROUTLEDGE, E. J.; BRIGHTY, G. C.; SUMPTER, J. P.; WALDOCK, M. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 32, n. 11, p. 1549-1558, 1998.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Endocrine disruptor screening program (EDSP)**. Washington, DC, 2007a. Disponível em: <<http://www.epa.gov/endo>>. Acesso em: 31 jan. 2010.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. What are endocrine disruptors? In: _____. **Endocrine disruptor screening program (EDSP)**. Washington, DC,

2007b. Disponível em: <<http://www.epa.gov/endo/pubs/edspoverview/whatare.htm>>. Acesso em: 31 jan. 2010.

EUROPEAN WORKSHOP ON ENDOCRINE DISRUPTERS, 2001, Aronsborg, Bålsta, Sweden. Sweden: WRc-NSF, 2001.

FAWELL, J.K.; SHEAHAN, D.; JAMES, H.A.; HURST, M.; SCOTT, S. Oestrogens and oestrogenic activity in raw and treated water in severn trent water. **Water Research**, Oxford, v. 35, n. 5, p. 1240-1244, 2001.

FERNANDEZ, M. P.; IKONOMOU, M. G.; BUCHANAN, I. An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 373, n. 1, p. 250-269, 2007.

FERREIRA, M. G. M. **Remoção da atividade estrogênica de 17 β -estradiol e de 17 α -etinilestradiol pelos processos de ozonização e O₃/H₂O₂**. 2008. Tese (Doutorado)–Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

GAIDO, K. W.; MCDONNELL, D. P.; SAFE, S. In vitro methods for characterizing chemical interactions with steroid hormone receptors. In: METZLER, M. (Ed.). **Endocrine disruptors, part I**. Berling: Springer-Verlag, 2001. p. 27-37. (The Handbook of Environmental Chemistry, 3-L).

GARCÍA-REYERO, R.; GRAU, E.; CASTILLO, M.; ALDA, M. J. L.; BARCELÓ, M.; PIÑA, B. Monitoring of endocrine disruptors in surface Waters by the yeast recombinant assay. **Environmental Chemistry**, v. 20, n. 6, p. 1152-1158, 2001.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 695-706, 2007.

GUILLETTE, L. J., JR.; EDWARDS, T. M. Environmental influences on fertility: can we learn lessons from studies of wildlife? **Fertility and Sterility**, New York, v. 89, n. 2 Suppl, p. e21-e24, 2008.

GUTENDORF, B.; WESTENDORF, J. Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. **Toxicology**, Amsterdam, v. 166, n. 1-2, p. 79-89, 2001.

HANSEN, P. D.; DIZER, H.; HOCK, B.; MARX, A.; SHERRY, J.; MCMASTER, M.; BLAISE, C. Vitellogenin - a biomarker for endocrine disruptors. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 17, n. 7, p. 448-451, 1998.

HAYES, T.; HASTON, K.; TSUI, M.; HOANG, A.; HAEFFELE, C.; YONK, A.; Feminization of male frogs in the wild: water-born herbicide threatens amphibian populations in parts of the United States. **Nature**, New York, v. 419, n. 6910, p. 895-896, 2002.

HOLBROOK, R. D.; NOVAK, J. T.; LOVE, N. G. Impact of activated sludge-derived colloidal organic carbon on behavior of estrogenic agonist recombinant yeast

bioassay. **Environmental Toxicology & Chemistry**, Malden, v. 24, n. 11, p. 2717-2724, 2005.

HUGGETT, D. B.; FORAN, C. M.; BROOKS, B. B.; WESTON, G.; PETERSON, B.; MARSH, K. E.; LA POINT, T. W.; SCHLENK, D. Comparison of in vitro and in vivo bioassays for estrogenicity in effluent from North American municipal wastewater facilities. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 72, n. 1, p. 77-83, 2003.

INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS. **Current status of test methods for detecting endocrine disruptors: in vitro estrogen receptor binding assays. Background review document**. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, 2002. (NIH Pub. No. 03-4504). Disponível em: <http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/endo_docs/final1002/erbnbrd/ERBd034504.pdf>. Acesso em: 31 jan. 2010.

ISIDORI, M.; BELLOTTA, M.; CANGIANO, M.; PARRELLA, A. Estrogenic activity of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Environment International**, Elmsford, v. 35, n. 5, p. 826-829, 2009.

JARDIM, W. F.; UMBUZEIRO, G. A.; BISINOTI, M. C. **Ocorrência e atividade estrogênica de interferentes endócrinos em água para consumo humano e mananciais do estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2007. Projeto de Pesquisa Temático, processo n. 07/58449-2. Aprovado em: 15 abr. 2008, Início: 1 maio 2008, Término: 30 abr. 2011.

JOBLING, S.; SHEAHAN, D.; OSBORNE, J. A.; MATTHIESSEN, P.; SUMPTER, J. P. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Lawrence, KS, v. 15, n. 2, p. 194-202, 1996.

JUNIOR, P. D. F. Aspectos ecológicos da determinação sexual em tartarugas. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 39, n. 1, p. 139-154, 2009.

KAVLOCK, R. J.; DASTON, G. P.; DEROSA, C.; FENNER-CRISP, P.; GRAY, L. E.; KAATTARI, S.; LUCIER, G.; LUSTER, M.; MAC, M. J.; MACZKA, C.; MILLER, R.; MOORE, J.; ROLLAND, R.; SCOTT, G.; SHEEHAN, D. M.; SINKS, T.; TILSON, H. A. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 104 Suppl 4, p. 715-40, 1996.

KIM, S. D.; CHO, J.; KIM, I. S.; VANDERFORD, B. J.; SNYDER, S. A. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. **Water Research**, Oxford, v. 41, n. 5, p. 1013-21, 2007.

KOLPIN, D. W.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; THURMAN, E. M.; ZAUGG, S. D.; BARBER, L. B.; BUXTON, H. T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 36, n. 6, p. 1202-11, 2002.

- KUCH, H. M.; BALLSCHMITER, K. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 35, n. 15, p. 3201-6, 2001.
- KUSTER, M.; AZEVEDO, D. A.; LOPEZ DE ALDA, M. J.; AQUINO NETO, F. R.; BARCELO, D. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). **Environment International**, Elmsford, v. 35, n. 7, p. 997-1003, 2009.
- LEE, H. B.; PEART, T. E. Determination of 17 beta-estradiol and its metabolites in sewage effluent by solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 81, n. 6, p. 1209-16, 1998.
- LEGLER, J.; ZEINSTRA, L. M.; SCHUITMAKER, F.; LANSER, P. H.; BOGERD, J.; BROUWER, A.; VETHAAK, A. D.; DEVOOGT, P.; MURK, A.; VAN DER BURG, B. Comparison of in vivo and in vitro reporter gene assays for short-term screening of estrogenic activity. **Environmental Science and Technology**, v. 36, n. 30, p. 4410-4415, 2002.
- LESKINEN, P.; VIRTÄ, M.; KARP, M. One-step measurement of firefly luciferase activity in yeast. **Yeast**, Chichester, v. 20, n. 13, p. 1109-13, 2003.
- LESKINEN, P.; MICHELINI, E.; PICARD, D.; KARP, M.; VIRTÄ, M. Bioluminescent yeast assays for detecting estrogenic and androgenic activity in different matrices. **Chemosphere**, Oxford, v. 61, n. 2, p. 259-266, 2005.
- LI, X. M.; LUO, F. N.; LIU, G. X.; ZHU, P. T. Bioassay of estrogenic activity of effluent and influent in a farm wastewater treatment plant using an in vitro recombinant assay with yeast cell. **Biomedical and Environmental Sciences**, Beijing, v. 21, n.5, p. 381-388, 2008.
- LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZEL, A. Endocrine disruptors in the environment - (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 75, n. 5, p. 631-681, 2003.
- LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of detection. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 55, n. 7, p. A712, 1983.
- MA, M.; RAO, K.; WANG, Z. Occurrence of estrogenic effects in sewage and industrial wastewaters in Beijing, China. **Environmental Pollution**, Barking, v. 147, n. 2, p. 331-6, 2007.
- MCDONNELL, D. P.; NAWAZ, Z.; DENSMORE, C.; WEIGEL, N. L.; PHAM, T. A.; CLARK, J. H.; O'MALLEY, B. W. High level expression of biologically active estrogen receptor in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 39, n. 3, p. 291-7, 1991.

- METCALFE, C. D.; METCALFE, T. L.; KIPARISSIS, Y.; KOENIG, B. G.; KHAN, C.; HUGHES, R. J.; CROLEY, T. R.; MARCH, R. E.; POTTER, T. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Environmental Toxicology & Chemistry**, Malden, v. 20, n. 2, p. 297-308, 2001.
- MOREIRA, D. S.; Aquini, S. F.; ROBSON, R. J. C. F.; SANTOS, E. P. P. C.; PADUA, V. L. Occurrence of endocrine disrupting compounds in water sources of Belo Horizonte metropolitan area, Brazil. **Environmental Technology**, Philadelphia, v. 30, n. 10, p. 1041-1049, 2009.
- MURK, A. J.; LEGLER, J.; VAN LIPZIG, M. M.; MEERMAN, J. H.; BELFROID, A. C.; SPENKELINK, A.; VAN DER BURG, B.; RIJS, G. B.; VETHAAK, D. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. **Environmental Toxicology & Chemistry**, Malden, v. 21, n. 1, p. 16-23, 2002.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Hormonally active agents in the environment**. Washington, DC: National Academy Press, 1999.
- NELSON, J.; BISHAY, F.; VAN ROODSELAAR, A.; IKONOMOU, M.; LAW, F. C. The use of in vitro bioassays to quantify endocrine disrupting chemicals in municipal wastewater treatment plant effluents. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 374, n. 1, p. 80-90, 2007.
- NISHIKAWA, J.; SAITO, K.; GOTO, J.; DAKEYAMA, F.; MATSUO, M.; NISHIHARA, T. New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 154, n. 1, p. 76-83, 1999.
- ORLANDO, E. F.; GUILLETTE, L. J., JR. Sexual dimorphic responses in wildlife exposed to endocrine disrupting chemicals. **Environmental Research**, New York, v. 104, n. 1, p. 163-73, 2007.
- ORT, C.; LAWRENCE, M. G.; REUNGOAT, J.; EAGLESAHM, G.; CARTER, S.; KELLER, J. Determining the fraction of pharmaceutical residues in wastewater originating from a hospital. **Water Research**, Oxford, v. 44, n. 2, p. 605-615, 2010.
- PAWLOWSKI, S.; TERNES, T.; BONERZ, M.; KLUCZKA, T.; VAN DER BURG, B.; NAU, H.; ERDINGER, L.; BRAUNBECK, T. Combined in situ and in vitro assessment of the estrogenic activity of sewage and surface water samples. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 75, n. 1, p. 57-65, 2003.
- QUIRÓS, L.; CÉSPEDES, R.; LACORTE, S.; VIANA, P.; RALDÚA, D.; BARCELÓ, D.; PIÑA, B. Detection and evaluation of endocrine-disrupting activity in water samples. **Environmental toxicology and Chemistry**, Lawrence, KS, v. 24, n. 2, p. 389-395, 2005.
- RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; LOPEZ DE ALDA, M. J.; BARCELO, D. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass

spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. **Journal of Chromatography A**, New York, v. 1152, n. 1-2, p. 97-115, 2007.

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**, Lawrence, KS, v. 15, n. 3, p. 241-248, 1996.

SALSTE, L.; LESKINEN, P.; VIRTÄ, M.; KRONBERG, L. Determination of estrogens and estrogenic activity in wastewater effluent by chemical analysis and the bioluminescent yeast assay. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 378, n. 3, p. 343-351, 2007.

SANSEVERINO, J.; GUPTA, R. K.; LAYTON, A. C.; PATTERSON, S. S.; RIPP, S. A.; SAIDAK, L.; SIMPSON, M. L.; SCHULTZ, T. W.; SAYLER, G. S. Use of *Saccharomyces cerevisiae* BLYES expressing bacterial bioluminescence for rapid, sensitive detection of estrogenic compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 8, p. 4455-60, 2005.

SANSEVERINO, J.; ELDRIDGE, M. L.; LAYTON, A. C.; EASTER, J. P.; YARBROUGH, J.; SCHULTZ, T. W.; SAYLER, G. S. Screening of potentially hormonally active chemicals using bioluminescent yeast bioreporters. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 107, n. 1, p. 122-34, 2009.

SCHRICKS, M.; HERINGA, M.B.; KOOL, M.M.E.; VOOGT, P.; WEZEL, A.P. Toxicological relevance of emerging contaminants for drinking water quality. **Water Research**, Oxford, v. 44, p. 461-476, 2010.

SILVA, E.; RAJAPAKSE, N.; KORTENKAMP, A. Something from "nothing"--eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 36, n. 8, p. 1751-6, 2002.

SODRÉ, F. F. (Coord.). **Identificação de interferentes endócrinos em águas: subsídio a avaliação das políticas de saneamento básico no Brasil**. Brasília: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, 2006. Projeto de Pesquisa.

SODRÉ, F. F.; MONTAGNER, C. C.; LOCATELLI, M. A. F.; W. F. JARDIM, W. F. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da região de Campinas (SP, Brasil). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, Rio Grande do Sul, v. 2, n. 2, 187-196, 2007.

SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Occurrence of emerging contaminants in Brazilian drinking waters: a sewage-to-tap issue. **Water, Air, & Soil Pollution**, Berlin, v. 206, n. 1-4, p. 57-67, 2010a.

SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Sistema limpo em linha para extração em fase sólida de contaminantes emergentes em águas naturais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 216-219, 2010b.

SODRÉ, F. F.; PESCARA, F.; MONTAGNER, C.; JARDIM, W. F. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, New York, v. 96, n. 1, p. 92-98, 2010.

SONNENSCHNEIN, C.; SOTO, A. M. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 65, n. 1-6, p. 143-150, 1998.

SOTO, A. M.; CALABRO, J. M.; PRECHTL, N. V.; YAU, A. Y.; ORLANDO, E. F.; DAXENBERGER, A.; KOLOK, A. S.; GUILLETTE, L. J., JR.; LE BIZEC, B.; LANGE, I. G.; SONNENSCHNEIN, C. Androgenic and estrogenic activity in water bodies receiving cattle feedlot effluent in Eastern Nebraska, USA. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 112, n. 3, p. 346-52, 2004.

STRECK, G. Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 28, n. 6, p. 635-652, 2009.

SUMPTER, J. Endocrine disruption in the aquatic environment. In: METZLER, M. (Ed.). **Endocrine disruptors, part II**. Berlin: Springer-Verlag, 2002. p. 271-289. (The Handbook of Environmental Chemistry, 3-M).

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

SUMPTER, J. P.; JOHNSON, A. C. Lessons from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environment. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 39, n. 12, p. 4321-4332, 2005.

TERNES, T. A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R. D.; SERVOS, M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants--I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 225, n. 1-2, p. 81-90, 1999.

TERNES, T. A.; ANDERSEN, H.; GILBERG, D.; BONERZ, M. Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC-MS-MS. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 74, n. 14, p. 3498-3504, 2002.

TOLLEFSEN, K. E.; HARMAN, C.; SMITH, A.; THOMAS, K. V. Estrogen receptor (ER) agonists and androgen receptor (AR) antagonists in effluents from Norwegian North Sea oil production platforms. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 54, n. 3, p. 277-283, 2007.

TOPPARI, J.; LARSEN, J. C.; CHRISTIANSEN, P.; GIWERCMAN, A.; GRANDJEAN, P.; GUILLETTE JR, L. J.; JEGOU, B.; JENSEN, T. K.; JOUANNET, P.; KEIDING, N.;

LEFFERS, H.; MCLACHLAN, J. A.; MEYER, O.; MULLER, J.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; SCHEIKE, T.; SHARPE, R.; SUMPTER, J.; SKAKKEBAEK, N. E. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 104, Suppl 4, p. 741-803, 1996.

VERMEIRSEN, E.L.M.; BURKI, R.; JORIS, C.; PETER, A.; SEGNER, H.; SUTER, M.J.F.; BURKHARDT-HOLM, P. Characterization of the estrogenicity of Swiss midland rivers using recombinant yeast bioassay and plasma vitellogenin concentration in feral male trout. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Lawrence, KS, v. 24, n. 9, p. 2226-2233, 2005.

RESUMO DE ARTIGO PUBLICADO

Journal of
Environmental
MonitoringCite this: *J. Environ. Monit.*, 2011, **13**, 3288

www.rsc.org/jem

PAPER

Bioluminescent yeast estrogen assay (BLYES) as a sensitive tool to monitor surface and drinking water for estrogenicity

Ana Marcela Di Dea Bergamasco,^a Melanie Eldridge,^b John Sanseverino,^b Fernando Fabriz Sodré,^c Cassiana Carolina Montagner,^d Igor Cardoso Pescara,^d Wilson Figueiredo Jardim^d and Gisela de Aragão Umbuzeiro^{a,e}

Received 11th June 2011, Accepted 20th September 2011

DOI: 10.1039/c1em10464k

Estrogenic Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) are a concern due to their ubiquity and recognized adverse effects to humans and wildlife. Methods to assess exposure to and associated risks of their presence in aquatic environment are still under development. The aim of this work is to assess estrogenicity of raw and treated waters with different degrees of pollution. Chemical analyses of selected EDCs were performed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and estrogenic activity was evaluated using *in vitro* bioluminescent yeast estrogen assay (BLYES). Most raw water samples (18/20) presented at least one EDC and 16 rendered positive in BLYES. When EDCs were detected, the bioassay usually provided a positive response, except when only bisphenol A was detected at low concentrations. The highest values of estrogenic activity were detected in the most polluted sites. The maximum estrogenic activity observed was 8.7 ng equiv. of E2 L⁻¹. We compared potencies observed in the bioassay to the relative potency of target compounds and their concentrations failed to fully explain the biological response. This indicates that bioassay is more sensitive than the chemical approach either detecting estrogenic target compounds at lower concentrations, other non-target compounds or even synergistic effects, which should be considered on further investigations. We have not detected either estrogenic activity or estrogenic compounds in drinking water. BLYES showed good sensitivity with a detection limit of 0.1 ng equiv. E2 L⁻¹ and it seems to be a suitable tool for water monitoring.

^aFaculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 580, CEP 05508-000 São Paulo, SP, Brazil

^bCenter for Environmental Biotechnology, University of Tennessee, Knoxville, Tennessee, 37996, USA

^cInstitute of Chemistry, University of Brasília, Caixa Postal 4478, CEP 72919-910 Brasília, DF, Brazil

^dInstitute of Chemistry, University of Campinas, Caixa Postal 6154, CEP 13083-970 Campinas, SP, Brazil

^eFaculty of Technology, University of Campinas, Rua Paschoal Marmo 1888, Jd Nova Itália, CEP 13484-332 Limeira, SP, Brazil. E-mail: giselau@ft.unicamp.br; Tel: +55 (19) 2113-3419

Introduction

The occurrence of estrogenic and estrogen-like compounds, known as endocrine disruptors (EDCs), has been observed in receiving waters worldwide^{1–5} and their presence is recognized as a challenge to the integrity of the biota⁶ but information about their presence in drinking water is still scarce in the literature.^{7,8} A few studies^{9–12} quantified both endogenous- and xeno-estrogens in raw water samples collected in Brazil, where the sewage is

Environmental impact

We used a recently new bioluminescent yeast estrogen assay to analyze raw and drinking water along with chemical analysis. Chemical analysis was performed with a LC-MS/MS technique. Most of the raw waters tested positive for EDCs and BLYES. For drinking water, no estrogenic activity was detected in the BLYES and none of the target compounds were detected. The assay proved to be sensitive for water analysis, easy to perform, relatively inexpensive and suitable for high throughput analysis, therefore a good option for water monitoring programs. The response of this assay could be used in exposure assessment (equivalent of E2 per litre) in the risk characterization of biota and humans regarding the adverse effects of estrogenic compounds in waters. In our point of view it could substitute expensive and high tech chemical analysis of estrogenic target compounds that act *via* binding in the estrogen receptor. The cost of the chemical approach in monitoring programs is indeed very high, but if the BLYES is applied it can be reduced and a good set of data can be generated providing information for prevention and enforcement actions.