



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro de Tecnologia e Ciências

Faculdade de Engenharia

Giselle Gomes

**Avaliação dos fatores de interferência no ensaio *in vitro* *Yeast Estrogen Screen* (YES) para análise de estrogenicidade em amostras ambientais, compostos orgânicos e misturas**

Rio de Janeiro

2020

Giselle Gomes

**Avaliação dos fatores de interferência no ensaio *in vitro* Yeast Estrogen Screen (YES)  
para análise de estrogenicidade em amostras ambientais, compostos orgânicos e  
misturas**



Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Área de concentração: Saneamento Ambiental – Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Daniele Maia Bila

Rio de Janeiro

2020

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

G633 Gomes, Giselle.  
Avaliação dos fatores de interferência no ensaio in vitro Yeast Estrogen Screen (YES) para análise de estrogenicidade em amostras ambientais, compostos orgânicos e misturas / Giselle Gomes. – 2020. 161f.

Orientadora: Daniele Maia Bila.  
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia.

1. Engenharia ambiental - Teses. 2. Estrógenos - Teses. 3. Compostos orgânicos - Teses. 4. Poluição - Teses. 5. Gestão ambiental - Teses. I. Bila, Daniele Maia. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia. III. Título.

CDU 504.3

Bibliotecária: Júlia Vieira – CRB7/6022

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

  
Assinatura

Rio de Janeiro, 02 de dezembro de 2020

Data

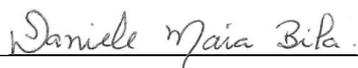
Giselle Gomes

**Avaliação dos fatores de interferência no ensaio *in vitro* Yeast Estrogen Screen (YES)  
para análise de estrogenicidade em amostras ambientais, compostos orgânicos e  
misturas**

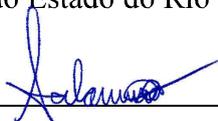
Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do título de doutor em Engenharia  
Ambiental, da Universidade do Estado do Rio  
de Janeiro (UERJ). Área de concentração:  
Saneamento Ambiental – Controle da Poluição  
Urbana e Industrial.

Aprovado em

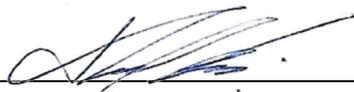
Banca examinadora:



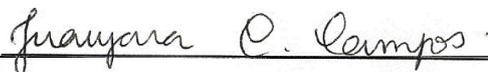
Professora Daniele Maia Bila (Orientadora)  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ



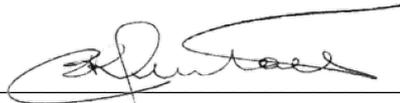
Professor André Luís de Sá Salomão  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ



Professora Renata de Oliveira Pereira  
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF



Professora Juacyara Carbonelli Campos  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ



Professora Bianca Ramalho Quintaes  
Companhia Municipal de Limpeza Urbana – COMLURB (Prefeitura da Cidade do  
Rio de Janeiro)

Rio de Janeiro

2020

## **DEDICATÓRIA**

Dedico, com muito amor, aos meus pais Deyze e Mauro, à minha avó Lina e à minha irmã Michelle.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Universo por ter me possibilitado seguir esse caminho acadêmico, caminho árduo, mas de grande realização. À Deus e à toda a espiritualidade por sempre ser minha rede de apoio, principalmente, nos momentos de ansiedade e desalento.

À minha mãe Deyze minha mais profunda gratidão por todo suporte e força para alcançar os meus objetivos, não tenho palavras para expressar todo o meu amor, mas tenho a certeza de que você não duvida dele.

Ao meu pai Mauro, que apesar dos nossos desencontros de pensamentos, tenho a certeza de que nos esforçamos, porém ainda não o suficiente, para reduzirmos nossas divergências, meu mais sincero obrigado por todo esforço, mesmo que desengonçado, para me ver feliz trilhando o meu caminho.

À minha irmã Michelle, tão diferente, mas ao mesmo tempo tão igual a mim, só posso agradecer por toda a força e conselhos (mesmo quando não pedi, porém podemos trabalhar isso) que me deu. Agradeço também por trazer a nossa pequena Lívia para a minha vida, ela me move, fortalece e equilibra sempre.

À minha avó Lina, por todo amor, cuidado e pelos muitos mimos que ganho. Serei sempre a sua “Giquinha” e você a minha teimosa.

À professora Dani Bila, que é minha inspiração, minha eterna gratidão pelos ensinamentos profissionais e pessoais. Uma vez você me disse que professores não formam só profissionais, formam gente e posso te dizer, com completa convicção, de que você cumpre com muito êxito a sua profissão. Obrigada pela oportunidade de trabalhar e aprender tanto com você, obrigada por cada abraço acolhedor, por cada ensinamento científico e também pessoal. Tenho muito amor, respeito e admiração por você. Obrigada!

A todos os professores do DEAMB e da UERJ obrigada pelos ensinamentos. E às agências de fomento FAPERJ, CNPq e CAPES obrigada pelo suporte financeiro. Apesar deste ser cada vez mais escasso na atual conjuntura do nosso país, seguimos na luta para o avanço da ciência.

Aos amigos do grupo de pesquisa do LES, vocês viraram amigos pessoais, somos uma família incrível e sem vocês o caminho teria sido muito mais difícil. Com muito amor, agradeço a todos pelas contribuições científicas, emocionais e psicológicas para a elaboração dessa tese.

Allan (meu primeiro orientando, que hoje “me orienta”), Thaynara (Deusa da comunicação, da intensidade e expressão de sentimentos organizados), Tainá (começamos uma amizade discreta, mas agora seria muito difícil trilhar sem você, é pra você que eu mais amo fazer drama, para exercitar seu lado frio de uma boa aquariana), Mitai (a vida vive unindo nossos caminhos e eu amo isso), Stellinha (sempre tão plena e questionadora, perguntas tão inteligentes e instigantes que ajudam a compreender a vida), Louise (amo tanto, é tão parecida comigo que deveria falar tudo que me fala olhando no espelho), Aninha (diva da moda, sempre com um olhar doce e um abraço confortante), Sidnei (companheiro de cerveja, opa quis dizer de café), Fabi (exemplo de fortaleza), Lazza (tão assertiva) à vocês meu muito obrigada pelas mesas-redondas diárias, com temas tão diversos, profundos ou superficiais, científicos ou pessoais, abrangendo todas áreas de conhecimento, compartilhando alegrias, dramas, experiências e nos tornando cada vez mais próximos nessa jornada da vida.

♥ Gratidão ♥

De modo geral, não é a observação de fenômenos raros e escondidos que só são apresentáveis por meio de experimentos que serve para a descoberta das mais importantes verdades, mas a observação daqueles fenômenos que são evidentes e acessíveis a todos. **Por isso a tarefa não é ver o que ninguém viu ainda, mas pensar aquilo que ninguém pensou a respeito daquilo que todo mundo vê.**

*Arthur Schopenhauer*

## RESUMO

GOMES, Giselle. *Avaliação dos fatores de interferência no ensaio in vitro Yeast Estrogen Screen (YES) para análise de estrogenicidade em amostras ambientais, compostos orgânicos e misturas*. 2020. 161f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – UERJ, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Os bioensaios têm sido recomendados para o monitoramento de desreguladores endócrinos no meio ambiente. Com isso, há um crescente interesse em ensaios com baixos limites de detecção e quantificação. O ensaio *Yeast Estrogen Screen* (YES) permite a análise de xenoestrogênios pela ativação transcricional do ER, fornecendo informações de atividade estrogênica total em bioequivalência (equivalente  $17\beta$ -estradiol – EQ-E2). Este estudo teve como objetivo avaliar os interferentes das respostas desse ensaio. Fatores como: variação na densidade celular inicial, tempo de incubação, comprimento de onda usado para a leitura e veículo da substância de referência do ensaio foram analisados. Além disso, amostras ambientais (água potável, água superficial, efluente e afluente de estação de tratamento de esgoto, lixiviado bruto e tratado de aterro sanitário e sedimento), compostos orgânicos isolados ( $17\beta$ -estradiol,  $17\alpha$ -etinilestradiol, estrona, estriol, bisfenol-A, etilparabeno, butilparabeno, metilparabeno, propilparabeno, fulvestrant, atrazina, simazina, triclosan, cafeína e nonilfenol) e misturas de estrogênios ( $17\beta$ -estradiol,  $17\alpha$ -etinilestradiol, estrona, estriol) e bisfenol-A foram usados para o estudo desses fatores. A densidade celular inicial e o tempo de incubação do ensaio influenciaram diretamente na sensibilidade do método. No entanto, os resultados expressos em EQ-E2 e em potência relativa (PR) não sofreram influência. Amostras de água superficial, por exemplo, apresentaram resultados semelhantes para os testes de 48 e 72h de incubação do ensaio. Em contrapartida, os resultados da CE50 (concentração que efetiva 50% da resposta do ensaio) variaram dependentemente desses fatores e o uso da carta-controle para a substância de referência conferiu maior confiabilidade aos resultados, garantindo o monitoramento da média da CE50 e sua dispersão. O menor limite de detecção calculado para o método foi de  $7 \pm 3 \text{ ng L}^{-1}$  e atingiu o valor de  $0,28 \pm 0,12 \text{ ng L}^{-1}$  após a divisão pelo maior fator de concentração final (500 x) aplicado à matriz ambiental. Da mesma forma, o menor limite de quantificação calculado foi  $21 \pm 10 \text{ ng L}^{-1}$ , atingindo  $0,84 \pm 0,4 \text{ ng L}^{-1}$  após considerar o fator de concentração final da amostra (500 x). Esses limites atendem ao máximo limite de detecção proposto pelo documento 2018/840/UE para o monitoramento do  $17\beta$ -estradiol em águas superficiais por métodos cromatográficos, o que destaca a aplicabilidade do ensaio. Ademais, com a avaliação dos fatores interferentes na análise da estrogenicidade de amostras ambientais, compostos orgânicos e misturas, um protocolo otimizado e uma lista de recomendações para a implementação e realização do ensaio YES com segurança e confiabilidade nos resultados foram elaborados.

Palavras-chave: Ensaio YES (*Yeast estrogen screen*); Atividade estrogênica; Desreguladores endócrinos; Estrogênios; Xenoestrogênios; Matrizes ambientais.

## ABSTRACT

GOMES, Giselle. *Assessment of interfering factors in Yeast Estrogen Screen assay (YES) towards evaluation of estrogenicity in environmental samples, organic compounds and chemical mixtures*. 2020. 161f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – UERJ, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Bioassays have been used for the monitoring of endocrine disruptors in the environment. For this reason, the interest in low quantification and detection limits has increased. The Yeast Estrogen Screen – YES assay identifies the xenoestrogens effects through the transcriptional activation of ER, providing information on total estrogenic activity in bioequivalence (17 $\beta$ -estradiol equivalent – E2-EQ). The aim of this work was to evaluate the possible interferences on this assay, some of them were analyzed, such as variation of initial cellular density, incubation duration, wavelength used for the reading and vehicle of the test reference substance of the YES assay. Environmental samples (drinking water, surface water, effluent and affluent from sewage treatment plant, raw leachate and treated leachate and sediment), organic compounds (17 $\beta$ -estradiol, 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol, estrone, estriol, bisphenol-A, ethylparaben, butylparaben, methylparaben, propylparaben, propylparaben, propylparaben, atrazine, simazine, triclosan, caffeine and nonylphenol) and mixtures of estrogens (17 $\beta$ -estradiol, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, estrone, estriol) and bisphenol-A were selected as evaluating tools on this work. The initial cell density and the incubation time length of the assay influenced directly on the method sensitivity. However, the results expressed in E2-EQ and RP did not show any variation. Surface water showed similar responses for the 48 hours and 72 hours of incubation. In contrast, EC50 results showed dependency on these factors and the usage of control-chart has shown more reliable results since it allows to monitor the average of EC50 and its dispersion. The lowest limit of detection calculated for the method was  $7 \pm 3 \text{ ng L}^{-1}$  and reached  $0.28 \pm 0.12 \text{ ng L}^{-1}$  after the division by the highest final concentration factor applied to the environmental matrix. Likewise, the lowest limit of quantification calculated was  $21 \pm 10 \text{ ng L}^{-1}$  reaching  $0.84 \pm 0.4 \text{ ng L}^{-1}$  after considering the sample final concentration factor. These limits meet the maximum LOD proposed by document 2018/840/EU for E2 monitoring in surface waters by chromatographic methods. In addition, assessment of interfering factors in YES assay towards evaluation of estrogenicity in environmental samples, organic compounds and chemical mixtures provided an optimized protocol and a list of recommendations for the implementation and performance of the YES assay with safe and reliable results.

Keywords: Yeast estrogen screen assay; Estrogenic activity; Endocrine disruptors; Estrogens; Xenoestrogens; Environmental samples.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mecanismo de ação genômica e não genômica de hormônios esteroides .....	22
Figura 2 – Fontes e destinos dos desreguladores endócrinos no meio ambiente .....	25
Figura 3 – Mecanismo de ação de hormônios e dos desreguladores endócrinos .....	26
Figura 4 – Esquema do sistema de expressão do ER induzido por substâncias estrogênicas em <i>Sacharomyces cerevisiae</i> BJ1991 .....	36
Figura 5 – Fluxograma geral das fases 1 e 2 realizadas neste estudo.....	49
Figura 6 – Esquema da metodologia de preparo do congelamento, pré-inóculo e inóculo das células da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	52
Figura 7 – Exemplo de arranjo de amostras e controles (positivo E2 e negativo) na placa de 96 poços seguido no ensaio YES realizados nesse estudo .....	53
Figura 8 – Etapas de procedimento do ensaio YES para a análise de atividade estrogênica e antiestrogênica .....	55
Figura 9 – Esquema dos inóculos (inóculo 1 e 2) para a elaboração da curva de crescimento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> – Tipo A foi o inóculo no início do ensaio - 0 hora, Tipo B – 12 horas após o inóculo Tipo A. As siglas x e x1 são duplicatas provenientes do tipo A e foram inoculadas nos erlenmeyers 1 e 2 (24 horas após o início do ensaio); y e y1 também são duplicatas provenientes do inóculo Tipo A e foram inoculados nos erlenmeyers 3 e 4 após decorridos 30 horas do início do ensaio e w e w1 são duplicatas provenientes do inóculo tipo B e foram inoculados nos erlenmeyers 5 e 6 após decorridos 36 horas do início do ensaio .....	57
Figura 10 – Curva dose-resposta do controle positivo E2 para exemplificação do cálculo do limite de detecção do ensaio YES .....	59
Figura 11 – Fluxograma das etapas dos métodos empregados para a preparação de amostras ambientais para a realização do ensaio YES .....	69
Figura 12 – Foto do cartucho Strata-SAX acoplado ao Strata- X para remoção dos interferentes, durante a realização da EFS, das amostras de afluente e efluente de ETE, sedimento e lixiviado de aterro sanitário .....	70
Figura 13 – Curva de crescimento obtida a partir do inóculo da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (estirpe BJ1991) – Condições experimentais: Densidade celular inicial do inóculo: $1,35 \times 10^6$ células mL <sup>-1</sup> , temperatura: 28°C e rotação: 150 rpm, tempo de crescimento: 55 horas .....	76

Figura 14 – Curva de correlação entre densidade óptica obtida por meio da leitura de absorvância no espectrofotômetro (620nm) e densidade celular (células mL <sup>-1</sup> ) obtida através da contagem direta de células com a câmara de Neubauer e o microscópio.....	78
Figura 15 – Curvas dose-resposta do controle positivo E2 com diferentes densidades iniciais de células (1.35 x 10 <sup>6</sup> , 2.7 x 10 <sup>6</sup> e 4.05 x 10 <sup>6</sup> células mL <sup>-1</sup> ) para 48 horas e 72 horas de incubação do ensaio .....	79
Figura 16 – Absorbância do substrato CPR medida na faixa de 500 a 660 nm .....	82
Figura 17 – Cartas controles do ensaio YES para o controle positivo E2: (A) sem padronização do protocolo utilizado e (B) com um protocolo padronizado e otimizado obtido na fase 1 desse estudo, garantindo uma distribuição mais uniforme dos valores da CE50.....	84
Figura 18 – Formação e comportamento das curvas de dose-resposta do controle positivo durante o período de incubação – (A) Todas as 72 horas e (B) Principais tempos .....	87
Figura 19 – Valores de EQ-E2 de amostras de água superficial determinados com dados de absorvância de períodos de incubação de 48 e 72 h.....	89
Figura 20 – Curvas dose-resposta de amostras de água superficial com (A) 48 horas e (B) 72 horas de duração de incubação do ensaio .....	89
Figura 21 – Curvas dose resposta do controle positivo E2 (54,48 µg L <sup>-1</sup> ) em solução aquosa	90
Figura 22 – Valores totais de EQ-E2 e curvas dose-resposta de amostras não concentradas de lixiviado bruto de aterro sanitário.....	91
Figura 23 – Curvas de dose-resposta das monossoluções de compostos orgânicos avaliadas pelo ensaio YES: (A) Estrogênios, (B) Nonilfenol, Bisfenol-A e Fulvestrant, (C) Parabenos e (D) Atrazina, Simazina, Triclosan e Cafeína .....	95
Figura 24 – Curvas dose-resposta das monossoluções dos compostos ICI182,780 + E2 e E2 individualmente .....	98
Figura 25 – Curvas dose-resposta das misturas e das monossoluções analisadas (A) E2 + EE2; (B) E2 + E1; (C) E2 + E3; (D) E2 + BPA; (E) EE2 + E1; (F) EE2 +E3; (G) EE2 + BPA; (H) E1 + E3; (I) E1 + BPA; (J) E2 + EE2 + E1 +E3; (K) (L) E2 + EE2 + E1 +E3 + BPA .....	101
Figura 26 – Distribuição em boxplot de valores EQ-E2 (ng L <sup>-1</sup> ) para as frações dissolvidas das matrizes ambientais avaliadas (AS – água superficial, AP – água potável, AF – afluente de ETE, EF – efluente de ETE, LB – lixiviado bruto de aterro sanitário, LT – lixiviado tratado de aterro sanitário).....	107
Figura 27 – Valores totais de EQ-E2 de amostras de água superficial: distribuição percentual entre as fases particulada e dissolvida .....	113

Figura 28 – Valores totais de EQ-E2 de amostras de lixiviado bruto de aterro sanitário: amostras não concentradas e distribuição percentual entre as fases particulada e dissolvida .....	114
Figura 29 – Curvas dose-resposta do extrato de amostra de água superficial (AS) testado com e sem adição de E2 na microplaca para avaliação da atividade antiestrogênica .....	116
Figura 30 – Curva dose-resposta de amostras de lixiviado bruto de aterro sanitário: (A) LB 1, (B) LB 2, (C) LB 3, (D) LB 4.....	117
Figura A – Arranjo da placa de ensaio contendo 1 amostra, 1 controle positivo E2 e controle negativo intercalando com as fileiras de amostras e controle positivo. Fileiras B, D, F, H – controle negativo; fileiras A e C – 12 diluições amostra; fileiras E e G – 12 diluições do controle positivo E2.....	148

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Desreguladores endócrinos avaliados quanto à atividade estrogênica e antiestrogênica através da atividade transcricional do ER em leveduras .....	27
Tabela 2 – Lista de substâncias em vigilância para monitoramento conforme estabelecido no artigo 8b da Diretiva 2008/105/CE.....	34
Tabela 3 – Valores de CE50 e Potência Relativa de composto orgânicos individuais analisados por ensaios baseados em gene repórter em leveduras .....	41
Tabela 4 – Atividade estrogênica de matrizes ambientais expressa em EQ-E2.....	46
Tabela 5 – Compostos orgânicos e misturas analisadas com suas respectivas concentrações (soluções estoque e faixa de concentração testada no ensaio).....	62
Tabela 6 – Descrição das amostras, método de preparação aplicado e endpoint avaliado (estrogênico/antiestrogênico).....	66
Tabela 7 – Limites de detecção para diferentes densidades celulares e tempos de incubação do ensaio .....	80
Tabela 8 –Valores de PR, citotoxicidade e LD das monossoluções de compostos orgânicos analisadas pelo ensaio YES (as concentrações nominais das soluções estoques e as testadas no ensaio foram apresentadas na Tabela 5).....	93
Tabela 9 – ANOVA para valores de EQ-E2 observados e estimados das misturas analisadas com resultados estatisticamente significativos ( $p$ -valor < 0,05) .....	100
Tabela 10 – Recomendações e soluções para as possíveis interferências na implementação e execução do ensaio in vitro Yeast Estrogen Screen (YES) para análise de estrogenicidade em amostras ambientais, compostos orgânicos e misturas.....	122
Tabela A – Materiais, equipamentos e reagentes necessários para o preparo das amostras, das soluções e para a realização do ensaio YES.....	142
Tabela B – Preparo das diluições das amostras concentradas e do controle positivo E2 em etanol.....	147
Tabela C – Preparo das diluições das amostras sem concentração e do controle positivo E2 em solução aquosa.....	147

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
AF	Afluente de ETE
AP	Água potável
AR	Receptor de androgênio
AS	Água superficial
BP	Butilparabeno
BP	Butilparabeno
BPA	Bisfenol-A
CE50	Concentração que efetiva 50% da resposta do ensaio
CPR	clorophenol red
CPRG	Chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside
DE	Desregulador(es) endócrino(s)
E1	Estrona
E2	17 $\beta$ -estradiol
E3	Estriol
EE2	17 $\alpha$ -etinilestradiol
EF	Efluente de ETE
EFS	Extração em fase sólida
EP	Etilparabeno
EP	Etilparabeno
EQ-E2	Equivalente de 17 $\beta$ -estradiol
EQS	<i>Environmental quality standards</i>
ER	Receptor de estrogênio
ETA	Estação de tratamento de água
ETE	Estação de tratamento de esgoto
ICI 182,780	Fulvestrant
LB	Lixiviado bruto
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
LT	Lixiviado tratado

MP	Metilparabeno
MP	Metilparabeno
NP	Nonilfenol
PP	Propilparabeno
PP	Propilparabeno
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
PR	Potência relativa
RAR/RXR	Receptor de retinoide
S	Sedimento
TR	Receptor da tireoide
YES	Yeast estrogen screen

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>1. OBJETIVOS</b> .....	20
<b>1.1. Objetivo geral</b> .....	20
<b>1.2. Objetivos específicos</b> .....	20
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	21
<b>2.1. Sistema endócrino</b> .....	21
2.1.1. Mecanismos de ação dos hormônios.....	21
2.1.1.1. Via genômica .....	23
2.1.1.2. Via não genômica .....	24
<b>2.2. Desreguladores endócrinos (DE)</b> .....	24
2.2.1. Atividade estrogênica e antiestrogênica de desreguladores endócrinos .....	25
2.2.2. Efeitos adversos dos desreguladores endócrinos .....	31
2.2.3. Legislação para desreguladores endócrinos.....	32
<b>2.3. Ensaio de ativação transcricional do receptor de estrogênio (ER)</b> .....	34
2.3.1. Ensaio <i>in vitro</i> <i>Yeast Estrogen Screen</i> (YES).....	36
2.3.1.1. Vantagens e desvantagens do ensaio <i>Yeast Estrogen Screen</i> (YES) .....	37
2.3.1.2. Variações de metodologias relatadas na literatura .....	40
2.3.1.3. Análise de compostos orgânicos individuais .....	41
2.3.1.4. Análise de misturas .....	44
2.3.1.5. Análise de amostras ambientais .....	45
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	48
<b>3.1. Visão geral da metodologia</b> .....	48
<b>3.2. Materiais e reagentes</b> .....	50
<b>3.3. Ensaio <i>Yeast Estrogen Screen</i> (YES)</b> .....	50
3.3.1. Cultivo da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	51
3.3.2. Ensaio YES para avaliação da atividade estrogênica de compostos e amostras ambientais.....	52
3.3.3. Ensaio YES para a avaliação da atividade antiestrogênica.....	54
<b>3.4. Fase 1: Investigação e avaliação dos fatores que interferem na resposta do ensaio YES</b> .....	56

3.4.1.	Curva de crescimento da levedura e curva de correlação entre densidade ótica e densidade celular .....	56
3.4.2.	Variação na densidade celular inicial no ensaio .....	58
3.4.3.	Avaliação do espectro de absorção de CPR e seleção do comprimento de ondas... 58	
3.4.4.	Carta controle, limites de detecção e quantificação do ensaio YES e teste de recuperação.....	59
3.4.5.	Variação do tempo de incubação das placas no ensaio.....	60
3.4.6.	Curva dose-resposta do controle positivo E2 em solução aquosa e análise de amostras não concentradas de lixiviado bruto de aterro sanitário .....	61
<b>3.5.</b>	<b>Fase 2: Avaliação da atividade estrogênica e antiestrogênica de compostos orgânicos, misturas e matrizes ambientais.....</b>	<b>62</b>
3.5.1.	Atividade estrogênica de compostos orgânicos e suas misturas .....	62
3.5.2.	Amostras ambientais .....	65
3.5.2.1.	Preparo das amostras.....	69
3.5.2.1.1.	Método 1: Material dissolvido .....	70
3.5.2.1.2.	Método 2: Material particulado .....	71
3.5.2.1.3.	Método 3: Sedimento.....	71
3.5.2.1.4.	Método 4: Amostras não concentradas .....	72
<b>3.6.</b>	<b>Expressão dos resultados.....</b>	<b>72</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>4.1.</b>	<b>Fase 1: Investigação e avaliação dos fatores que interferem no ensaio YES....</b>	<b>75</b>
4.1.1.	Curva de crescimento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e curva de correlação entre densidade ótica e densidade celular.....	75
4.1.2.	Variação da densidade celular inicial e do tempo de incubação do ensaio para o controle positivo E2.....	78
4.1.3.	Avaliação do espectro de absorção do CPR e seleção do comprimento de onda para a leitura do ensaio .....	81
4.1.4.	Carta controle, limites de detecção e quantificação e teste de recuperação.....	83
4.1.5.	Variação da duração do tempo de incubação do ensaio de amostras ambientais ...	86
4.1.6.	Curvas dose-resposta do controle positivo E2 em solução aquosa.....	90
4.1.7.	Consolidação dos resultados da fase 1 .....	92
<b>4.2.</b>	<b>Fase 2: Avaliação da atividade estrogênica e antiestrogênica de monossoluções de compostos orgânicos, misturas e matrizes ambientais.....</b>	<b>93</b>

4.2.1.	Atividade estrogênica de monossoluções de compostos orgânicos .....	93
4.2.2.	Atividade estrogênica de misturas .....	98
4.2.3.	Atividade estrogênica de amostras ambientais .....	107
4.2.3.1.	Água potável .....	108
4.2.3.2.	Água superficial .....	109
4.2.3.3.	Afluente e efluente de ETE .....	110
4.2.3.4.	Lixiviado bruto e tratado de aterro sanitário .....	111
4.2.3.5.	Material particulado e amostras não concentradas .....	112
4.2.3.6.	Sedimento .....	115
4.2.4.	Atividade antiestrogênica de amostras ambientais .....	116
4.2.5.	Consolidação dos resultados da Fase 2 .....	118
<b>4.3.</b>	<b>Recomendações para a implementação e execução do ensaio YES.....</b>	<b>119</b>
	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>124</b>
	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>127</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>128</b>
	<b>APÊNDICE 1 – Publicações do grupo de pesquisa .....</b>	<b>139</b>
	<b>APÊNDICE 2 – Protocolo otimizado do ensaio YES obtido na Fase 1.....</b>	<b>142</b>
	<b>APÊNDICE 3 – EQ-E2 estimados e observados das misturas analisadas .....</b>	<b>152</b>
	<b>APÊNDICE 4 – ANOVA Misturas.....</b>	<b>153</b>
	<b>APÊNDICE 5 – Valores de EQ-E2 (faixas, frequências de detecção, média, mediana e valores de desvio padrão) e citotoxicidade (frequência e valor máximo) das matrizes ambientais analisadas.....</b>	<b>154</b>
	<b>APÊNDICE 6 – Resultados de EQ-E2 e citotoxicidade referentes à fase dissolvida das amostras ambientais de água potável, água superficial, afluente e efluente de ETE e lixiviado bruto e tratado de aterro sanitário .....</b>	<b>155</b>
	<b>APÊNDICE 7 – Resultados de EQ-E2 e citotoxicidade referentes ao material particulado &lt; 0.7 e &gt;0.7µm e às amostras sem a realização das etapas de filtração e concentração por EFS ...</b>	<b>158</b>
	<b>APÊNDICE 8 – Resultados de EQ-E2 e citotoxicidade referentes ao extrato de sedimentos..</b>	<b>159</b>
	<b>ANEXO 1 – Preparo das soluções do ensaio YES .....</b>	<b>160</b>

## INTRODUÇÃO

Há uma crescente preocupação com a presença de compostos desreguladores endócrinos (DE) no meio ambiente, pois essas substâncias podem ocasionar efeitos nocivos à saúde humana e aos ecossistemas (BERGMAN et al., 2012). No entanto, a detecção e a avaliação dos efeitos de desreguladores endócrinos ainda são um grande desafio, dada à concentração de sua ocorrência e aos recursos existentes para a sua quantificação. Portanto, cada vez mais há a necessidade de métodos que detectem substâncias estrogênicas em baixas concentrações, nos níveis de  $\text{ng L}^{-1}$  e  $\mu\text{g L}^{-1}$ , em matrizes ambientais complexas.

Devido à complexidade das matrizes ambientais, várias recomendações foram feitas para a integração de bioensaios no monitoramento da qualidade da água (ALTENBURGER et al., 2015; BRACK et al., 2016; DI PAOLO et al., 2016). Os bioensaios podem superar o desafio da avaliação dos potenciais efeitos da presença de misturas químicas em matrizes ambientais, ao contrário das técnicas cromatográficas que avaliam compostos isolados não fornecendo informações sobre a ação conjunta.

Os bioensaios não identificam os compostos presentes em uma matriz ambiental, mas podem complementar a análise química de várias maneiras. Podem fornecer informações adicionais e ser usados como uma ferramenta de triagem que antecede a análise química em caso de respostas positivas, ou mesmo ser utilizados se os métodos químicos não atingirem os limites de detecção exigidos (HETTWER et al., 2018).

A seleção de um bioensaio específico para avaliação de DE envolve a preocupação se o ensaio: (i) pode prever os efeitos desencadeados em organismos expostos e realmente fornece ferramentas para a compreensão dos mecanismos de ação implícitos; (ii) pode ser facilmente utilizado em larga escala no monitoramento de DE e seus efeitos no meio ambiente; (iii) tem reprodutibilidade, repetibilidade e sensibilidade para ser usado em matrizes ambientais.

O ensaio *Yeast Estrogen Screen* (YES) atende aos requisitos mencionados acima, indicando uma boa adequação. Este ensaio possui um mecanismo de ação específico que permite a detecção e a quantificação da atividade estrogênica em níveis baixos, na ordem de  $\text{ng L}^{-1}$  (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996; KETHAN, 2014). Este é um ensaio de ativação transcricional do receptor de estrogênio (ER) que abrange a análise de DE com ação genômica

e pode ser usado como uma ferramenta de triagem e, portanto, tem sido indicado para o monitoramento de DE em larga escala no ambiente

Particularmente, o ensaio YES permite quantificar a atividade estrogênica total, incluindo efeitos aditivo, sinérgico e alguns casos de antagonismo em termos da concentração equivalente de 17 $\beta$ -estradiol (EQ-E2). Este ensaio tem sido usado para a avaliação de substâncias individuais, bem como para misturas e amostras ambientais (BERESFORD et al., 2000; KOLLE et al., 2010; RAMIREZ et al., 2014; RUTISHAUSER et al., 2004; WIECZERZAK et al., 2016; YU et al., 2019) e embora seja um ensaio padronizado pela ISO 19040-1 de 2018, ainda existem alguns fatores interferentes do ensaio que devem ser estudados.

Por exemplo, alguns autores, propuseram algumas modificações no protocolo do ensaio original, como a seleção do comprimento de onda, a variação do tempo de incubação e a densidade celular (BERESFORD et al., 2000; BRIX et al., 2010; FRISCHE et al., 2009; HETTWER et al., 2018). No entanto, essas modificações foram usadas sem uma avaliação completa dos resultados dos testes realizados.

Desse modo, foi realizado um estudo exploratório sobre essas questões com o objetivo de elucidar informações e mitigar interferências no ensaio, permitindo maior confiabilidade e segurança ao seu uso. Notavelmente, a elucidação dessas questões pode facilitar a implementação e a utilização do ensaio YES como uma ferramenta para a análise da atividade estrogênica.

Portanto, para obter maior compreensão sobre ensaios de ativação transcricional do ER em leveduras, o objetivo do presente estudo foi a avaliação dos fatores interferentes no ensaio YES para a avaliação da estrogenicidade em amostras ambientais (água potável e de superfície, efluente e afluente de estação de tratamento de esgoto (ETE), sedimentos e lixiviado bruto e tratado de aterro sanitário), misturas químicas e substâncias individuais. Além disso, o preparo de amostras ambientais que foi aplicado neste estudo, também poderá ser usado como referência para o preparo de amostras para outros ensaios *in vitro*, *in vivo* e até mesmo para métodos analíticos.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1. Objetivo geral

Investigar os fatores que influenciam o ensaio *in vitro* *Yeast Estrogen Screen* (YES) para a quantificação da atividade estrogênica de compostos orgânicos, misturas e amostras ambientais, sendo elas: água potável e superficial, afluente e efluente de ETE, sedimento e lixiviado bruto e tratado de aterro sanitário.

### 1.2. Objetivos específicos

- Investigar a influência das variações nas condições do ensaio YES no resultado da atividade estrogênica, sendo elas: densidade celular inicial, tempo de incubação do ensaio, seleção do comprimento de onda para a leitura da resposta, análise de amostras em solução aquosa.
- Avaliar a atividade estrogênica de mono soluções de compostos orgânicos (17 $\beta$ -estradiol (E2), 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2), estrona (E1), estriol (E3), bisfenol-A (BPA), etilparabeno (EP), butilparabeno (BP), metilparabeno (MP), propilparabeno (PP), fulvestrant (ICI 182,780), atrazina, simazina, triclosan, caféina e nonilfenol).
- Investigar o efeito das misturas de estrogênios (E2, EE2, E1, E3) e BPA na resposta da atividade estrogênica.
- Avaliar a atividade estrogênica e antiestrogênica de matrizes ambientais.
- Elaborar recomendações para a implementação e execução do ensaio YES.
- Elaborar um protocolo para o ensaio YES com as condições adequadas para amostras ambientais com maior e com menor concentração de xenoestrogênios.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Sistema endócrino

O sistema endócrino é responsável pela regulação de processos biológicos, tais como crescimento, reprodução, manutenção, homeostase e metabolismo, desde a concepção até a fase adulta dos seres vivos que o possuem (COLE et al., 2019). Para isso, glândulas do sistema endócrino (tais como: hipotálamo, hipófise, tireoide, paratireoides, pâncreas, adrenais, testículos em machos e ovários em fêmeas) produzem e secretam hormônios na corrente sanguínea. Estes atuam como sinais químicos em receptores específicos de suas células alvo.

O tempo de síntese, secreção e atuação dos hormônios é cuidadosamente coordenado pelo organismo para manter a homeostase corporal (KHETAN, 2014). Desse modo, a saúde humana depende do bom funcionamento do sistema endócrino.

Algumas substâncias, conhecidas como DE, podem alterar o funcionamento desse e dos demais sistemas fisiológicos sensíveis aos hormônios (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009). Estas alterações podem proporcionar o aumento do risco de efeitos adversos à saúde.

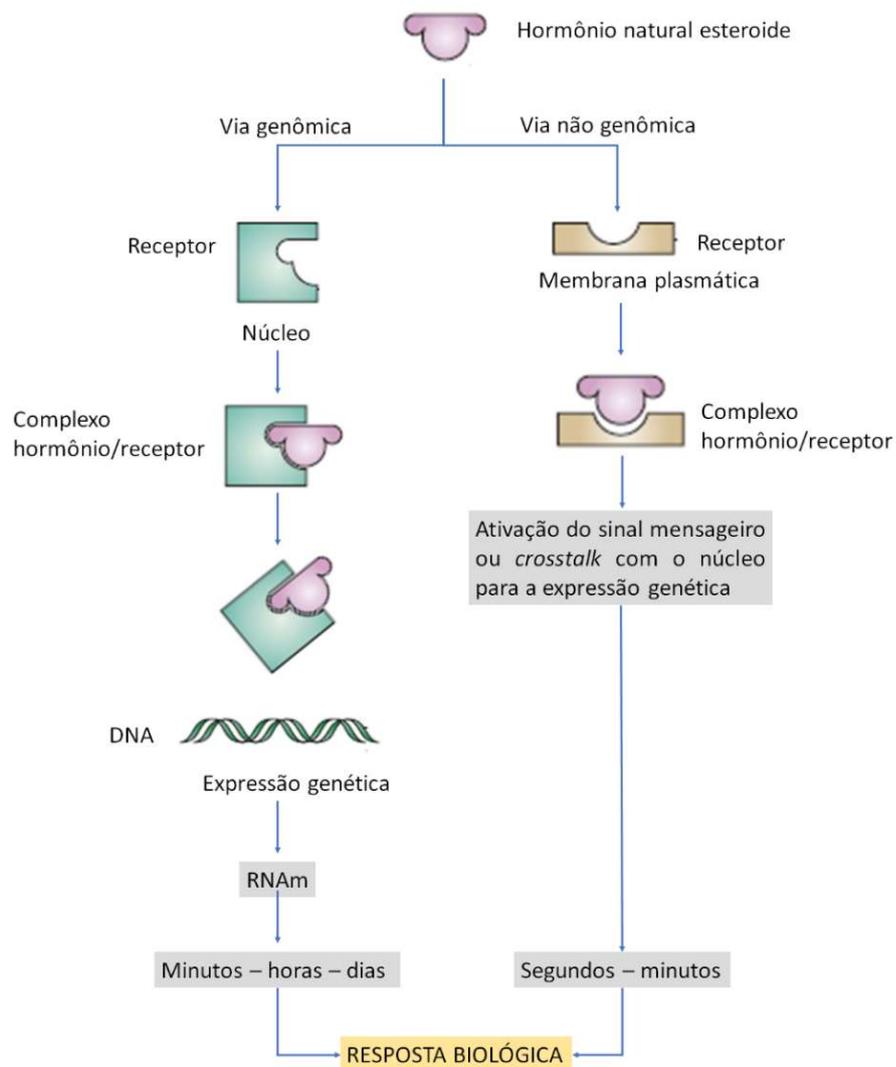
#### 2.1.1. Mecanismos de ação dos hormônios

Os hormônios atuam se ligando ao seu receptor específico em sua célula alvo. Os receptores celulares hormonais incluem os receptores nucleares e os receptores da membrana plasmática da célula. Os receptores nucleares são: de estrogênio (ER), de androgênio (AR), da tireoide (TR), os ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR) e de retinoide (RAR/RXR) (KHETAN, 2014).

De acordo com o receptor alvo (nuclear ou de membrana) os hormônios podem desencadear ações via genômica ou não genômica, a depender de sua afinidade com os receptores. O mecanismo via genômica se inicia quando o hormônio se liga ao receptor no

citoplasma e o complexo hormônio/receptor migra para o núcleo e altera diretamente a expressão do RNA mensageiro, este processo pode demorar minutos, horas ou dias. O mecanismo via não genômica é mediado por hormônios que se ligam ao receptor presente na membrana celular e emitem a resposta biológica final em segundos ou minutos (Figura 1) (NORMAN et al., 2004; VERTINO et al., 2005).

Figura 1 – Mecanismo de ação genômica e não genômica de hormônios esteroides



Legenda: O mecanismo de ação via genômica inicia quando um hormônio esteroide se liga ao receptor no citoplasma, em seguida, o complexo hormônio/receptor migra para o núcleo e altera a expressão gênica (RNAm). O processo pode demorar minutos, horas ou dias para produzir uma resposta biológica. O mecanismo via não genômica produz uma resposta rápida mediada pela ligação de hormônios aos receptores da membrana plasmática (que em alguns casos pode ser um receptor nuclear associado à membrana). As respostas biológicas finais podem ocorrer de duas maneiras: diretamente através da emissão de sinais ou indiretamente por meio da modulação de respostas genômicas (*crosstalk* – um ou mais componentes de uma via de sinal afetam outra). Fonte: Adaptado de Norman et al. (2004)

As células e os órgãos são regulados pela complexa interação entre ações genômicas e não genômicas dos hormônios, as quais são responsáveis por uma variedade de processos fisiopatológicos. O mecanismo clássico de ação genômica, que envolve a ligação de um hormônio esteroide lipofílico a um receptor no citoplasma da célula alvo e conseqüentemente a modulação da expressão gênica é bem caracterizado e estabelecido na literatura. No entanto, as respostas não genômicas rápidas mediadas por receptores associados a membrana plasmática ainda não são completamente compreendidas (SCHWARTZ et al., 2016).

#### 2.1.1.1. Via genômica

As células possuem uma membrana que separa o meio intracelular do extracelular, essa membrana celular é formada por uma dupla camada fosfolipídica intercalada com colesterol e proteínas (muitas são receptores de sinais químicos) (SCHWARTZ et al., 2016). A constituição da membrana plasmática permite uma permeabilidade seletiva, onde as substâncias lipofílicas conseguem adentrar a célula, enquanto as hidrofílicas não.

Desse modo, os hormônios que atuam pela via genômica são os hormônios lipossolúveis, como os hormônios esteroides e os da tireoide. Esses hormônios são secretados na corrente sanguínea, atravessam a membrana plasmática por difusão e se ligam e ativam um receptor proteico localizado no citoplasma ou no núcleo. Assim, permitem que este receptor se torne competente para interagir diretamente com elementos de respostas de genes específicos do DNA e module a transcrição genética, seguida da síntese de sua proteína específica. Essa proteína que é produzida pelo RNAm sintetizado gera a resposta biológica que pode ser: manter a homeostase, regular o crescimento ou controlar outros processos específicos (COLE et al., 2019; DARBRE, 2015; VRTAČNIK et al., 2014).

Esse mecanismo é chamado de via genômica porque a resposta do receptor é através da transcrição genética. O transporte do receptor de hormônio ativo para o núcleo e a transcrição, tradução e acumulação de quantidade significativa de proteínas pode demorar dias, apresentando uma resposta lenta (VRTAČNIK et al., 2014).

### 2.1.1.2. Via não genômica

Inicialmente acreditava-se que os hormônios esteroides atuavam somente se ligando aos receptores nucleares, no entanto a ação genômica não explicaria algumas rápidas respostas biológicas, como a abertura de canais de íons, detectada em poucos minutos após mudanças na concentração de esteroides (SCHWARTZ et al., 2016).

A explicação se deve ao fato de que alguns hormônios são moléculas grandes ou muito polares para ultrapassarem a membrana plasmática, então eles se ligam às proteínas presentes na membrana que atuam como um sítio receptor nas células alvo. Desse modo, o mecanismo via não genômica é mediado pela ligação de hormônios à receptores na membrana plasmática (KHETAN, 2014).

Neste caso, os hormônios são os primeiros mensageiros que proporcionam a ativação de um segundo sinal no citoplasma, como a abertura de canais de íons, que ocasiona mudanças no potencial da membrana plasmática, alterando o comportamento celular, por exemplo (SCHWARTZ et al., 2016).

Todos os tipos de hormônios esteroides, incluindo hormônios gonadais (estrogênios, progestinas e androgênios), hormônios da tireoide e corticosteroides podem atuar via não genômica (CHESKIS et al., 2007)

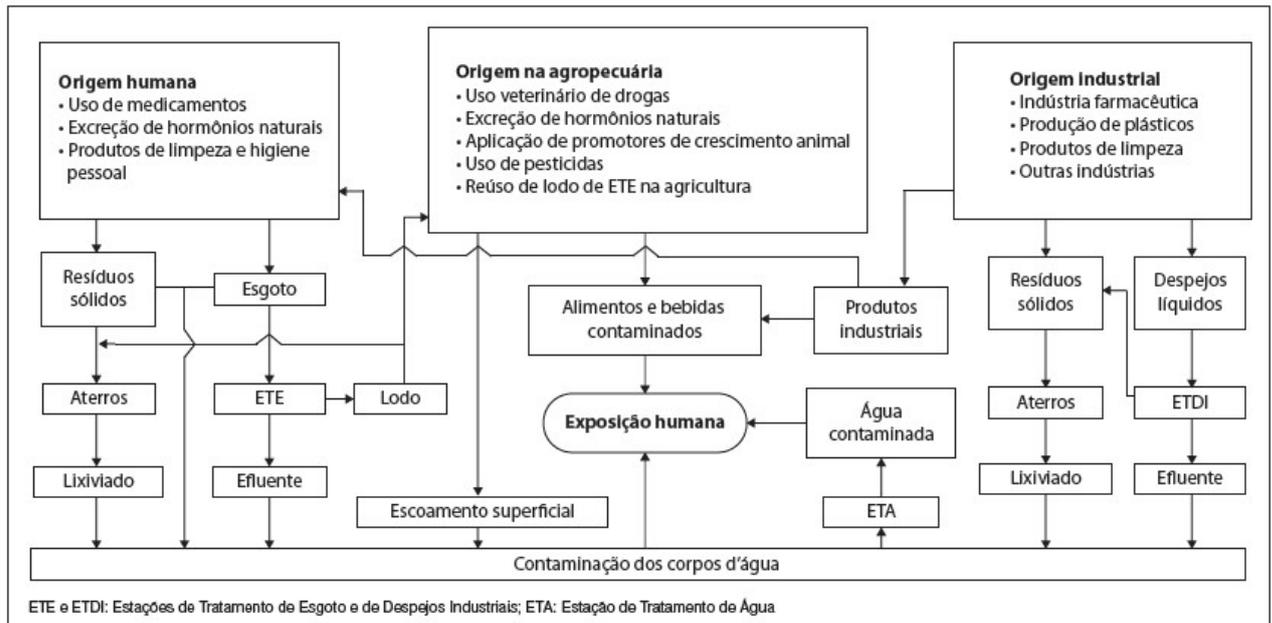
## 2.2. Desreguladores endócrinos (DE)

Os DE são substâncias exógenas ou misturas que causam alterações no funcionamento do sistema endócrino de seres vivos, possivelmente causando efeitos adversos para a saúde do organismo exposto, de sua progênie ou de (sub) populações (WHO, 2012).

Estes compostos podem ser provenientes de inúmeras fontes: fármacos, metais, produtos industriais, pesticidas (inseticidas, fungicidas e herbicidas), produtos de cuidados pessoais, hormônios naturais e sintéticos. E podem atingir o meio ambiente por diferentes rotas,

seja através de resíduos humanos, agricultura ou indústria, podendo chegar às águas superficiais e de subsolo através dos efluentes e de lixiviado de aterros sanitários (Figura 2).

Figura 2 – Fontes e destinos dos desreguladores endócrinos no meio ambiente



Fonte: Aquino (2013)

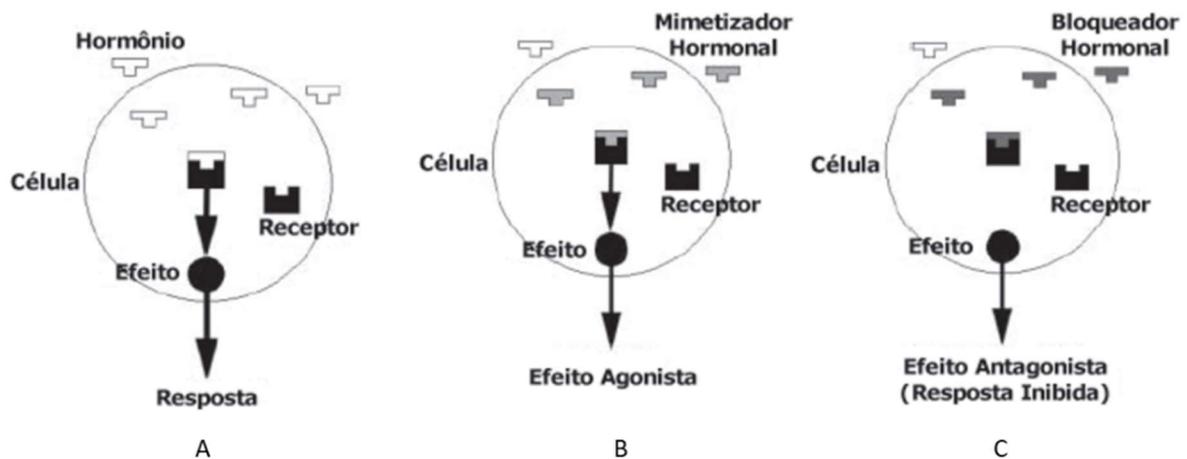
Essas fontes e vias de entrada desses compostos no meio constituem descargas químicas contínuas e em conjunto com a lipofilicidade e persistência dos DE possibilitam a bioacumulação e a biomagnificação dessas substâncias no meio, induzindo a uma globalização do problema de desregulação endócrina (VEGA-MORALES et al., 2013).

### 2.2.1. Atividade estrogênica e antiestrogênica de desreguladores endócrinos

Na maioria das vezes, os DE atuam mimetizando os hormônios naturais, ou seja, por afinidade bioquímica eles se ligam ao receptor em detrimento do hormônio, produzindo um

efeito agonista (Figura 3.B). No entanto, alguns DE podem antagonizar a ação dos hormônios, atuando como um bloqueador, inibindo a resposta e a função esperada dos hormônios endógenos (Figura 3.C).

Figura 3 – Mecanismo de ação de hormônios e dos desreguladores endócrinos



Legenda: (A) Hormônio se liga ao sítio do receptor e produz a resposta desejada, (B) DE se liga ao sítio do receptor e produz uma resposta diferente do natural, (C) DE se liga ao sítio do receptor bloqueando e inibindo qualquer resposta.

Fonte: Adaptado de Birkett e lester (2003)

Conforme supra explicado, os ligantes endógenos (hormônios) atuam, nos receptores nucleares, como fatores de transcrição para ativar ou reprimir a expressão gênica (Figura 3 A), então quando um ligante exógeno, como os DE, se liga ao ER, desenvolvendo ações agonistas ou antagonistas (Figura 3 B e Figura 3 C), ocorre o desequilíbrio dos níveis de hormônios esteroides na circulação sanguínea e, portanto, a homeostase hormonal fica comprometida. Além disso, eles ainda podem modificar a síntese, o metabolismo e o transporte dos hormônios endógenos, produzindo uma série de problemas metabólicos, neurológicos, de desenvolvimento, de reprodução e/ou de imunidade em humanos e outros seres vivos.

Kolle et al. (2010) enumeraram a atividade de diversos DE através da atividade transcricional do ER em leveduras (ensaio *in vitro* YES), na Tabela 1 seguem os resultados por

eles encontrados. Entretanto, é importante evidenciar que ensaios *in vivo* podem apresentar respostas diferentes das apresentadas por Kolle et al. (2010), pois um organismo completo engloba a análise de efeitos provenientes de múltiplos mecanismos, como biodisponibilidade, metabolismo e *crosstalk* entre via genômica e não genômica (um ou mais componentes de uma via de sinal afetam outra) (FOLMAR et al., 2002, 2000; HUGGETT et al., 2003; SCHWARTZ et al., 2016; ZACHAREWSKI et al., 1995).

Tabela 1 – Desreguladores endócrinos avaliados quanto à atividade estrogênica e antiestrogênica através da atividade transcricional do ER em leveduras

<b>Composto</b>	<b>Classe</b>	<b>E</b>	<b>A</b>
1 $\alpha$ , 25-Di-hidroxitamina D3 (Calcitriol)	Outros produtos químicos	—	+
Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético	Outros produtos químicos	—	+
2,4-Di-hidroxi-benzo-fenona	Antiandrogênio	+	*
2-Etil-hexil-p-hidroxi-benzoato	Estrogênio	+	*
4,4' - (1,3-Fenileno-diisopropilideno) bis-fenol	Estrogênio	+	*
4,4'-bifenol	Antiandrogênio	+	—
4,4'-ciclo-hexilideno-bisfenol	Estrogênio	+	*
4,4'-DDD (diclorodifenil-dicloroetano)	Antiandrogênio	—	—
4,4'-Di-hidroxi-difenil-metano	Estrogênio	+	*
4,4'-Sulfidifenol	Estrogênio	—	+
4-Androstene-3,17-dione	Outros produtos químicos	—	—
4-n-octilfenol	Outros produtos químicos	—	+
4-t-Butilpirocatecol	Outros produtos químicos	+	+
4-tert-octilfenol	Outros produtos químicos	+	*
6 $\alpha$ -Metil-17 $\alpha$ -hidroxi-progesterona	Androgênio	—	+

*Continua*

*Continuação*

Tabela 1 – Desreguladores endócrinos avaliados quanto à atividade estrogênica e antiestrogênica através da atividade transcricional do ER em leveduras

<b>Composto</b>	<b>Classe</b>	<b>E</b>	<b>A</b>
Apigenina	Estrogênio	+	—
Atrazina	Outros produtos químicos	—	—
Benzofenona	Antiandrogênio	+	+
Benzilbutilftalato	Antiandrogênio	+	—
Bicalutamide	Antiandrogênio	—	+
Bis (2-etilhexil) ftalato (DEHP)	Outros produtos químicos	—	—
Bisfenol A	Estrogênio	+	—
Bisfenol A-dimetacrilato	Estrogênio	+	—
Dibutilftalato	Outros produtos químicos	+	—
Clordecona (kepone)	Outros produtos químicos	*	—
Citrato de clomifeno	Outros produtos químicos	+	+
Corticosterona	Outros produtos químicos	—	+
Coumestrol	Estrogênio	+	—
Cicloheximida	Outros produtos químicos	—	+
Ciproteronacetato	Antiandrogênio	—	+
Daidzein	Estrogênio	+	—
Ácido deoxicólico	Outros produtos químicos	—	—

*Continua*

*Continuação*

Tabela 1 – Desreguladores endócrinos avaliados quanto à atividade estrogênica e antiestrogênica através da atividade transcricional do ER em leveduras

<b>Composto</b>	<b>Classe</b>	<b>E</b>	<b>A</b>
Dexametasona	Outros produtos químicos	—	—
Dibenz [a, h] antraceno	Outros produtos químicos	—	+
Dietilestilbestrol	Estrogênio	+	—
Dietilestilbestrol-dipropionato	Estrogênio	+	—
Diidrotestosterona	Androgênio	+	—
Diidroximetoxiclor (HPTE)	Estrogênio	+	—
Diisononilftalato (DINP)	Outros produtos químicos	—	—
Dimetil formamida	Detergentes, solventes,	—	—
Ftalato de di-n-amilftalatodipentilo	Antiandrogênio	—	+
Di-n-propilftalato	Outros produtos químicos	+	—
Estradiol	Estrogênio	+	—
Estradiol-3-benzoato	Estrogênio	+	—
Estrona	Estrogênio	+	—
Etinilestradiol	Estrogênio	+	—
Fenarimol	Estrogênio	+	—
Finasterida	Antiandrogênio	—	—
Flavone	Outros produtos químicos	—	+
Fluoximesterona	Androgênio	—	—
Genisteína	Estrogênio	+	—
Hidroxifiltramida	Antiandrogênio	—	—
Hidroxitamoxifeno	Antiestrogênio	+	+

*Continua*

*Continuação*

Tabela 1 – Desreguladores endócrinos avaliados quanto à atividade estrogênica e antiestrogênica através da atividade transcricional do ER em leveduras

<b>Composto</b>	<b>Classe</b>	<b>E</b>	<b>A</b>
ICI 182,78'	Antiestrogênio	+	—
Kaempferol	Estrogênio	+	—
Cetoconazol	Outros produtos químicos	—	—
Linuron	Antiandrogênio	—	—
Methoxiclor	Estrogênio	+	—
Metiltestosterona	Androgênio	+	+
Metiltrienolona (R1881)	Androgênio	+	—
Mifepristone	Outros produtos químicos	—	—
Nilutamida	Antiandrogênio	—	—
o, p'-DDT (1,1,1-tricloro-2- (2-clorofenil) -2- (4-clorofenil) etano)	Estrogênio	+	—
p, p'-DDE (1,1' - (2,2-dicloroeteno-1,1-diil) bis (4-clorobenzeno))	Antiandrogênio	—	—
Procloraz	Antiandrogênio	—	+
Procymidon	Outros produtos químicos	—	—
Progesterona	Outros produtos químicos	—	+
p-t-butilfenol	Outros produtos químicos	+	+
Resveratrol	Estrogênio	—	—
Espironolactona	Antiandrogênio	—	—
Tamoxifeno	Antiestrogênio	*	+
Testosterona	Androgênio	+	+

*Continua*

*Continuação*

Tabela 1 – Desreguladores endócrinos avaliados quanto à atividade estrogênica e antiestrogênica através da atividade transcricional do ER em leveduras

<b>Composto</b>	<b>Classe</b>	<b>E</b>	<b>A</b>
Trembolona	Androgênio	+	—
Vinclozolina	Antiandrogênio	—	—
Vitamina D3 (Colecalciferol)	Outros produtos químicos	—	+

(E) atividade estrogênica, (A) atividade antiestrogênica, (—) negativo, (+) positivo, (\*) A avaliação completa do composto não foi possível devido à citotoxicidade.

Falsos negativos foram excluídos da avaliação, se a toxicidade foi observada

Fonte: Kollé et al. (2010)

### 2.2.2. Efeitos adversos dos desreguladores endócrinos

Há alguns anos, a exposição a DE em águas tem sido associada a uma série de impactos na reprodução de peixes, incluindo a indução de intersex (presença do órgão sexual feminino e masculino simultaneamente) (JOBILING et al., 1998), diminuição dos níveis de hormônios (FOLMAR et al., 1996) e redução da capacidade de produção de gametas e de fertilização (JOBILING et al., 2002).

Os efluentes de ETE contém uma complexa mistura de DE, ou potenciais DE, sendo difícil apontar o composto específico por ocasionar a desregulação endócrina. Baseado nas concentrações encontradas em efluentes e em estudos laboratoriais para detectar a potência estrogênica, os compostos como 17 $\beta$ -estradiol, 17 $\alpha$ -etinilestradiol, estrona, nonilfenol, e BPA tem sido identificados como parte dos possíveis causadores (YU et al., 2019).

Os efeitos adversos ocasionados pelos DE tem se tornado uma importante questão, principalmente, para a comunidade científica, mas também tem chamado a atenção pública e governamental desde que fármacos usados em métodos contraceptivos, como o 17 $\alpha$ -etinilestradiol, foram associados à efeitos tóxicos em peixes (NASH et al., 2004).

Como o sistema endócrino em humanos funciona de forma similar aos animais, surgiu a preocupação com os efeitos em seres humanos e pesquisas apontaram que os DE estão associados a distúrbios nos hormônios da tireoide, aumento da incidência de más-formações em órgãos reprodutivos em recém-nascidos, início precoce da puberdade em meninas (KHETAN, 2014), diminuição na qualidade do esperma (LI et al., 2011), câncer testicular de células germinativas (CHIA et al., 2010) câncer de mama (CRAIN et al., 2008; ROY et al., 2009), obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares (NEWBOLD, 2010; THAYER et al., 2012).

Os DE também estão associados a transmissão de problemas de saúde por gerações, tanto em machos como em fêmeas (BREHM e FLAWS, 2019). Desse modo, os mecanismos específicos de ação dos DE são bastante complexos e ainda não são completamente compreendidos, pois o tempo entre a ação e o impacto ocasionado pelo DE é longo, dificultando as pesquisas.

### 2.2.3. Legislação para desreguladores endócrinos

No Brasil, as concentrações-limite para manter a qualidade dos recursos hídricos são estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 357 de 2005, que em 2011 foi complementada com a Resolução CONAMA nº 430. Estas resoluções dispõem sobre a classificação dos corpos de água superficiais e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, respectivamente.

Existe também o Anexo XX da portaria de consolidação nº 5 do Ministério da Saúde (anteriormente chamado de Portaria nº 2914) que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Assim como, a Resolução CONAMA nº 396 de 2008 que define a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas. Essas legislações brasileiras contemplam valores-limite para substâncias como alguns agrotóxicos e metais, que são DEs, porém estabelecem esses limites baseado em danos não referentes a desregulação endócrina. Caso os limites fossem referentes a desregulação endócrina, provavelmente as concentrações

estipuladas seriam muito inferiores, pois os DE possuem a característica de ocasionarem danos em concentrações na ordem de  $\mu\text{g L}^{-1}$  e  $\text{ng L}^{-1}$ .

É importante destacar que mediante a tamanha capacidade de contaminação do meio ambiente, de exposição dos seres humanos e de outros animais surge a necessidade de legislações rigorosas quanto ao lançamento de DE no ambiente. Para tanto, as pesquisas são fundamentais, pois permitem a elucidação das concentrações de DE associadas aos efeitos em humanos e animais, permitindo a estipulação de concentrações limites para lançamento de DE.

A União Europeia apresenta um avanço no que tange a legislação de DE, pois embora também não tenha o estabelecimento de concentrações limites para o lançamento dessas substâncias, algumas regulamentações foram publicadas oficialmente. A diretiva 2000/60/CE de 2000 foi o primeiro marco no domínio da política da água na Europa, onde foi estabelecido a estratégia para definir os riscos e quais substâncias seriam priorizadas.

Em 2008, uma lista de 33 substâncias/grupo de substâncias prioritárias e seus respectivos controles de qualidade ambiental (EQS - *environmental quality standards*) foi ratificado pela diretiva 2008/105/CE de 2008.

Em 2013, a diretiva 2013/39/UE, recomendou atenção para o monitoramento e opções de tratamento para um grupo de 45 substâncias prioritárias, nesta diretiva 2 fármacos (o anti-inflamatório não esteroide diclofenaco e o hormônio sintético  $17\alpha$ -etinilestradiol -EE2) e o hormônio natural  $17\beta$ -estradiol (E2) foram recomendados para serem incluídos numa primeira lista de vigilância (*Watch list*) de 10 substâncias/grupos de substâncias para o monitoramento de seu lançamento pelo período de dois anos.

No primeiro trimestre de 2015, a *Watch list* para monitoramento em toda a União Europeia (conforme estabelecido no artigo 8b da Diretiva 2008/105/CE) foi alterada na Decisão 2015/495/UE de 20 de março de 2015. Além dos compostos diclofenaco, EE2 e E2, 3 antibióticos (azitromicina, claritromicina e eritromicina) foram incluídos, juntamente com outro hormônio natural (estrona - E1), alguns pesticidas, um filtro UV e um antioxidante comumente utilizado como aditivo alimentar.

Em junho de 2018, a decisão 2018/840/UE propôs o limite mínimo de detecção, para o monitoramento em águas superficiais, dos compostos previamente estipulados nas regulamentações anteriores (Tabela 2). Os limites estabelecidos neste documento são para métodos analíticos, porém, se considerar o uso de bioensaios, esses limites podem ser maiores,

pois os bioensaios oferecem a resposta em bioequivalência, fornecendo a resposta de um conjunto de substâncias e não a concentração de um único composto isolado.

Tabela 2 – Lista de substâncias em vigilância para monitoramento conforme estabelecido no artigo 8b da Diretiva 2008/105/CE

<b>Substância/Grupo de substâncias</b>	<b>Método analítico indicado</b>	<b>Máximo limite de detecção aceitável (ng L<sup>-1</sup>)</b>
17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2)	EFS – CL-MS-MS	0,035
17 $\beta$ -estradiol (E2), estrona (E1)	EFS – CL-MS-MS	0,4
Antibióticos (azitromicina, claritromicina e eritromicina)	EFS – CL-MS-MS	19
Metiocarbe	EFS – CL-MS-MS ou CG -MS	2
Neonicotinóides (Imidaclopride, Tiaclopride, Tiametoxam, Clotianidina e Acetamipride)	EFS – CL-MS-MS	8,3
Metaflumizone	ELL – CL-MS-MS ou EFS – CL-MS-MS	65
Amoxicilina	EFS – CL-MS-MS	78
Ciprofloxacino	EFS – CL-MS-MS	89

Métodos de extração: (ELL) extração líquido-líquido, (EFS) extração em fase sólida

Métodos analíticos: (CG-MS) Cromatografia gasosa – espectrometria de massa; (CL-MS-MS) Cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massa triplo quadrupolo

### 2.3. Ensaio de ativação transcricional do receptor de estrogênio (ER)

O ER funciona modulando a transcrição de genes de suas células alvo e os ensaios de gene repórter são baseados na capacidade de um composto ou mistura de compostos estimularem o ER dependente da atividade transcricional (DARBRE, 2015). Desse modo, a

expressão do gene repórter é o resultado de uma cascata de eventos que implicam na ativação do ER, indicando a atividade estrogênica do composto analisado.

Ensaio baseado em gene repórter são realizados com células de mamíferos ou de leveduras geneticamente modificadas, onde são introduzidas sequências de DNA do receptor fusionado com o elemento de resposta estrogênica (ERE) e seu respectivo gene repórter (KHETAN, 2014; DARBRE, 2015).

Existem diversos ensaios que usam linhagens celulares que contêm o ER em sua estrutura original, como os ensaios com células cancerígenas (T47D e MVLN, por exemplo). Ensaio com células de levedura não contêm o ER endogenamente, este é geneticamente inserido. Os ensaios que usam células cancerígenas geralmente codificam a enzima luciferase, enquanto o gene repórter utilizado nas leveduras codificam a enzima  $\beta$ -galactosidase (DARBRE, 2015).

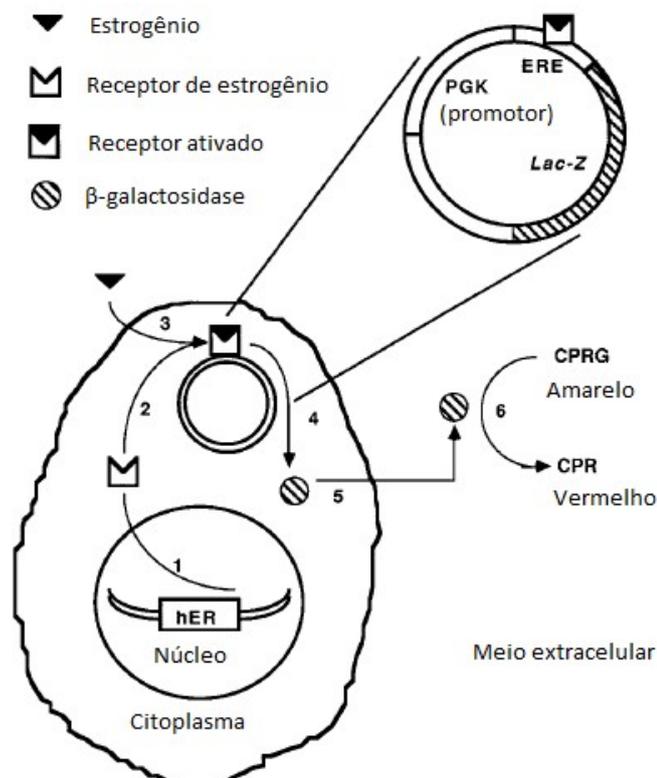
Genes repórter podem ser introduzidos temporariamente somente para a duração do ensaio ou permanentemente, gerando uma modificação genética estável (DARBRE, 2015). Independentemente do modo de construção genética das linhagens celulares utilizadas, as substâncias analisadas quando entram na célula, interagem com o ER ativando-o, em seguida ele se liga com outras estruturas celulares formando um complexo que se liga ao ERE do plasmídeo repórter. Estas ligações iniciam a expressão do gene repórter e a produção das enzimas (luciferase ou  $\beta$ -galactosidase) que metabolizam o substrato cromogênico específico adicionado ao meio em um produto de fácil detecção.

A mensuração da resposta agonista pode ser dada em potência relativa para substâncias individuais ou em bioequivalência para misturas e amostras ambientais. Como geralmente a substância de referência do ensaio é o E2, a resposta é dada em EQ-E2 (equivalente 17 $\beta$ -estradiol). A potência relativa mostra a potência estrogênica do composto em comparação a substância de referência do ensaio, enquanto o EQ-E2 evidencia a concentração estrogênica da amostra se todos os compostos presentes nela fossem E2. Para o estudo de substâncias antagonistas, as células são expostas à substância de referência e à substância a ser testada, simultaneamente, e a resposta do ensaio é referente a redução da atividade estrogênica da substância de referência.

### 2.3.1. Ensaio *in vitro* Yeast Estrogen Screen (YES)

A construção da estirpe utilizada para a realização do ensaio YES foi descrita por PURVIS et al. (1991) e ROUTLEDGE e SUMPTER (1996). A *Sacharomyces cerevisiae* BJ1991 foi usada na construção, onde o receptor de estrogênio humano é expresso sob o controle do promotor de metalotioneína de cobre (CUP1) da levedura. O promotor CUP1 é completamente controlado pela adição de cobre ao meio de cultivo. A construção dessa estirpe é estável, pois o ER foi integrado ao genoma da levedura. Adicionalmente a estirpe contém a construção do PGK-ERE-lacZ como plasmídeo repórter. O ERE proveniente do gene vitelogenina A2 de *Xenopus* foi fusionado ao gene lacZ, o qual codifica a enzima  $\beta$ -galactosidase para medir a atividade dos receptores (Figura 4).

Figura 4 – Esquema do sistema de expressão do ER induzido por substâncias estrogênicas em *Sacharomyces cerevisiae* BJ1991



Legenda: O gene do receptor de estrogênio humano é integrado ao genoma principal e é expresso (1) numa forma capaz de se ligar aos elementos de resposta ao estrogênio (ERE) dentro de um promotor híbrido no plasmídeo de expressão (2). A ativação do receptor (3), por ligação do ligante, provoca a expressão do gene repórter Lac-Z (4) que produz a enzima  $\beta$ -galactosidase. Esta enzima é secretada no meio (5) e metaboliza o substrato cromogênico CPRG (amarelo) em CPR (vermelho) (6), que pode ser medido por absorvância. Fonte: Adaptado de Routledge e Sumpter (1996)

A produção de  $\beta$ -galactosidase no meio depende da quantidade de ligantes ativos estrogênicos que se acoplam aos receptores das células de leveduras. Esta enzima degrada o substrato cromogênico CPRG (*Chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside*), que é adicionado ao ensaio, em CPR (*Chlorophenol red*) e a medida da absorbância, pela espectrofotometria, permite quantificar o CPR produzido, garantindo a quantificação de  $\beta$ -galactosidase secretada. Consequentemente, a quantidade de ligantes ativos que se acoplam aos receptores ativando ou inibindo o processo celular são mensurados, permitindo o cálculo da atividade estrogênica da amostra analisada.

#### 2.3.1.1. Vantagens e desvantagens do ensaio *Yeast Estrogen Screen* (YES)

Todos os ensaios apresentam suas respectivas vantagens e desvantagens. No ensaio YES de Routledge e Sumpter (1996), empregado e avaliado neste trabalho, o produto produzido pelo gene repórter ( $\beta$ -galactosidase) é secretado diretamente no meio e, portanto, a lise celular (ruptura da membrana plasmática) não é de caráter obrigatório para a realização do ensaio, caracterizando uma vantagem à essa metodologia.

Existem outros ensaios de transcrição do ER com leveduras similares (GAIDO et al., 1997; LORENZEN et al., 2004; METCALFE et al., 2013), porém estes necessitam, obrigatoriamente da lise celular, pois a  $\beta$ -galactosidase fica retida dentro da célula da levedura não estando disponível no meio para realizar a degradação do substrato cromogênico do ensaio.

Em um estudo comparativo empregado por Saito et al. (2002), foram analisados os ensaios YES de Routledge e Sumpter (1996) e de Gaido et al. (1997) e o *Yeast two-hybrid assay* de Nishikawa et al. (1999). O ensaio YES de Routledge e Sumpter foi o que apresentou melhor resposta, pois quantificou a atividade estrogênica de todas as amostras analisadas (n=13). Enquanto o de Gaido et al. (1997) quantificou 8 amostras e o de Nishikawa et al. (1999) quantificou 4 amostras, as demais amostras não foram quantificadas devido ao efeito de citotoxicidade que apresentaram. Este estudo demonstrou que o ensaio YES de Routledge e Sumpter (1996) foi mais tolerante aos compostos tóxicos presentes nas amostras ambientais analisadas.

Ensaio baseado em gene repórter com células de mamíferos, como por exemplo, o ensaio ER-CALUX com células T47D e o ensaio MVLN com células também nomeadas MVLN (derivadas da linhagem celular de câncer de mama - MCF7) possuem mecanismo de ação similares ao YES, onde a substância a ser analisada se liga e ativa o ER formando um complexo que se liga ao ERE, e este possuindo o gene da luciferase a libera para realizar a quebra do substrato luciferin presente no meio e a resposta é medida com um luminômetro. No entanto, geralmente as células de levedura são mais resilientes e resistentes às condições ambientais adversas, tornando o seu cultivo mais fácil que o de células de mamíferos que são particularmente sensíveis às variações de temperatura, pH, oxigênio dissolvido e certos metabólitos. Além disso, leveduras são mais resistentes a contaminantes ambientais, como metais pesados e endotoxinas bacterianas, em comparação às células de mamíferos (BREITHOFER et al., 1998).

Ensaio com leveduras possuem ainda a vantagem de não sofrerem interferência por receptores endógenos, hormônios esteróides, proteínas de ligação ou de metabolismo (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996; GAIDO et al., 1997), pois esse organismo não possui essas estruturas. O ensaio *E-screen*, por exemplo, pode apresentar falsos positivos devido a interação do ER endógeno com uma série de mitógenos, citocinas e nutrientes (ANDÒ et al., 2002; DIEL et al., 1999). A título de esclarecimento, o ensaio E-screen foi desenvolvido por Soto et al. (1995) e é um ensaio de proliferação celular que se baseia na exposição de células MCF7 à compostos estrogênicos na presença de um soro humano inibidor do crescimento celular. As substâncias estrogênicas neutralizam a ação desse soro, permitindo o crescimento celular e a resposta do ensaio é dada pela contagem de células ao final do ensaio.

O ensaio YES quando comparado a ensaios *in vivo* inclui menores custos financeiros e de consumo de tempo, bem como não depara com questões éticas relacionadas ao uso de animais experimentais. No entanto, os ensaios *in vitro* nem sempre preveem os efeitos que podem ser observados nos ensaios *in vivo*, pois estes permitem a análise de efeitos provenientes de múltiplos mecanismos, como biodisponibilidade, metabolismo e *crosstalk* entre via genômica e não genômica (FOLMAR et al., 2002, 2000; HUGGETT et al., 2003; ZACHAREWSKI et al., 1995).

Ensaio de ativação transcricional do ER, ao contrário dos ensaios de ligação ao ER, permite a classificação de substâncias como agonistas ou antagonistas. Os ensaios de ligação

ao ER não emitem uma resposta transcricional e são usados apenas para caracterizar se um determinado composto se liga ou não ao receptor de estrogênio (DARBRE, 2015).

O ensaio YES permite a identificação da atividade estrogênica total de uma amostra possibilitando a avaliação de misturas e de amostras ambientais, detectando as possíveis interações entre os compostos presentes na amostra (LEUSCH et al., 2018), permitindo determinar efeitos aditivos, sinérgicos e antagônicos. Ao contrário das análises cromatográficas que permitem a determinação e quantificação de um determinado composto, necessitando de métodos analíticos específicos para cada substância a ser analisada.

Desse modo, no ensaio YES nenhum componente desconhecido com atividade estrogênica é negligenciado e quaisquer efeitos de combinação são levados em consideração na análise de misturas e/ou amostras ambientais. Além disso, para a análise de compostos individuais, este ensaio fornece informações sobre a potência estrogênica, dado este que não pode ser obtido pelas análises cromatográficas.

Também é possível detectar a atividade estrogênica de compostos para os quais ainda não existem métodos analíticos sensíveis, pois o limite de detecção de bioensaios muitas vezes é mais baixo que muitos métodos cromatográficos, o que também permite que eles sejam usados quando estes não atingem os limites de detecção necessários (HETTWER et al., 2018).

Uma desvantagem inerente ao ensaio com leveduras é a presença da parede celular com um transporte ativo o que difere do mecanismo das células de mamíferos, podendo afetar a resposta da atividade de alguns compostos (LEGLER et al., 2002).

Alguns compostos antiestrogênicos não são detectados pelo ensaio YES, pois este não possui o complemento completo de proteínas repressoras adequadas necessárias para a detecção do antagonismo de alguns compostos (BERESFORD et al., 2000).

Outra desvantagem, inerente aos bioensaios, mas também às análises cromatográficas é o preparo da amostra, que pode demandar tempo e investimento em solventes e cartuchos. Quando há a necessidade de realizar a filtração das amostras ocorre a perda de compostos estrogênicos associados à fase particulada (sólidos suspensos). Em contrapartida, o preparo da amostra, seja filtração e/ou extração em fase sólida promove a purificação das amostras, reduzindo as chances de contaminação do ensaio, assim como, garantindo a detecção da atividade estrogênica.

### 2.3.1.2. Variações de metodologias relatadas na literatura

Ao longo do tempo os ensaios baseados em gene repórter em leveduras foram sofrendo adaptações em suas metodologias. No entanto muitas dessas adaptações não foram revistas e avaliadas quanto a sua eficiência para a detecção de atividade estrogênica.

Beresford et al. (2000) avaliaram a variação da densidade celular inicial no ensaio e relataram deslocamento das curvas dose-resposta para a esquerda, indicando o aumento da sensibilidade do ensaio, no entanto não analisaram a resposta do ensaio com essa modificação para as amostras ambientais.

Schultis e Metzger (2004) relataram que a etapa que demanda maior tempo para obter a resposta final do ensaio YES é a passagem da enzima  $\beta$ -galactosidase para o meio extracelular. Mediante a isso, adicionaram a etapa de digestão enzimática e química da membrana plasmática das células de *Saccharomyces cerevisiae* para obter maior permeabilidade e facilitar a liberação da  $\beta$ -galactosidase no meio.

Frische et al. (2009) realizaram a separação do ensaio YES em duas fases, onde na primeira fase ocorria o crescimento celular na presença da amostra, permitindo a expressão do ERE e na segunda fase era adicionado cicloheximida, para cessar o crescimento celular, e o CPRG, para concluir o processo do ensaio. O CPRG só foi adicionado na segunda fase porque os autores afirmam que a ausência deste durante a primeira fase do ensaio, evita possíveis interferências, provenientes da atividade estrogênica do produto de degradação do CPRG.

Hettwer et al. (2018) analisaram amostras ambientais sem a realização da etapa de concentração, no entanto, não foi demonstrado se os resultados seriam similares caso as amostras fossem concentradas.

Em 2018, foi publicada a norma ISO 19040-1 onde foi estabelecida uma padronização do ensaio YES, no entanto algumas questões, como a variação da densidade celular inicial, tempo de incubação de ensaio sem a etapa de lise celular e análise de amostras em solução aquosa ainda podem ser revistas.

### 2.3.1.3. Análise de compostos orgânicos individuais

Os compostos individuais foram os primeiros a serem analisados pelos ensaios baseados em gene repórter em leveduras. Inicialmente, as análises eram destinadas a reconhecer a estrogenicidade ou não de substâncias químicas. A análise de amostras sintéticas, como as monossoluções de compostos orgânicos individuais, é mais simples, pois esta permite a possibilidade de ajuste da concentração da substância a ser analisada, de modo a garantir que não seja tóxica ao organismo-teste e que seja acima do limite de detecção do método.

A análise de compostos individuais permite a determinação da potência relativa de um determinado composto comparado à substância de referência do ensaio. A Tabela 3 apresenta uma compilação de potências relativas determinadas e/ou a CE50 de diversas substâncias estudadas na literatura.

Tabela 3 – Valores de CE50 e Potência Relativa de composto orgânicos individuais analisados por ensaios baseados em gene repórter em leveduras

Substância	CE50 (ng.L <sup>-1</sup> )	PR	Referência
17 $\alpha$ -Estradiol	-	0,01	(MURK et al., 2002)
17 $\beta$ -Estradiol-valerato	352,9	0,21	(RUTISHAUSER et al., 2004)
2,4-bis (4-hidroxifenil)-4-metilpent-1-eno	3757,026	-	(FIC et al., 2014)
3-sulfato $\beta$ -estradiol	-	3 x 10 <sup>-4</sup>	(BERESFORD et al., 2000)
	-	3 x 10 <sup>-2</sup>	(BERESFORD et al., 2000)
	-	1 x 10 <sup>-1</sup>	(BERESFORD et al., 2000)
4-Onilfenol	-	1 x 10 <sup>-6</sup>	(CAJTHAML et al., 2009)
Benzilbutilftalato	-	1,0 x 10 <sup>-6</sup>	(MURK et al., 2002)
Bisfenol-A (BPA)	-	1 x 10 <sup>-4</sup>	(BERESFORD et al., 2000)
	-	1,0 x 10 <sup>-5</sup>	(MURK et al., 2002)
	456580	1,1 x 10 <sup>-4</sup>	(RUTISHAUSER et al., 2004)
	342435	1,2 x 10 <sup>-4</sup>	(BECK et al., 2006)

*Continua*

*Continuação*

Tabela 3 – Valores de CE50 e Potência Relativa (PR) de composto orgânicos individuais analisados por ensaios baseados em gene repórter em leveduras

<b>Substância</b>	<b>CE50 (ng.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>PR</b>	<b>Referência</b>
Bisfenol-A (BPA)	-	1 x 10 <sup>-6</sup>	(CAJTHAML et al., 2009)
	783034,7	-	(BALSIGER et al., 2010)
	821844	-	(FIC et al., 2014)
Bisfenol-AF	131129,7	-	(FIC et al., 2014)
Bisfenol-F	9350774,1	-	(FIC et al., 2014)
Butilfenol	-	1 x 10 <sup>-6</sup>	(BERESFORD et al., 2000)
Daidzeína	1.50E+07	2,5 x 10 <sup>-6</sup>	(BECK et al., 2006)
DHT	-	4 x 10 <sup>-3</sup>	(BERESFORD et al., 2000)
Di-(2-etil hexil) ftalato	-	0	(MURK et al., 2002)
Dietilftalato	-	5,0 x 10 <sup>-7</sup>	(MURK et al., 2002)
Dimetilftalato	-	1,0 x 10 <sup>-6</sup>	(MURK et al., 2002)
Di-n-butilftalato	-	1,0 x 10 <sup>-7</sup>	(MURK et al., 2002)
Diocetilftalato	-	0	(MURK et al., 2002)
Estriol (E3)	25665,8	2,4 x 10 <sup>-3</sup>	(RUTISHAUSER et al., 2004)
	6344,36	5,9 x 10 <sup>-3</sup>	(BECK et al., 2006)
Estrona (E1)	148,7	0,38	(RUTISHAUSER et al., 2004)
	243,33	0,25	(BECK et al., 2006)
	346,07	-	(BALSIGER et al., 2010)
Genisteína	270240	1,5 x 10 <sup>-4</sup>	(BECK et al., 2006)
	-	1,52x 10 <sup>-4</sup>	(BRIX et al., 2010)
	-	8,7 x 10 <sup>-5</sup>	(BRIX et al., 2010)
	-	2,2 x 10 <sup>-4</sup>	(BRIX et al., 2010)
	-	2,6 x 10 <sup>-4</sup>	(BRIX et al., 2010)
HPTE	-	8 x 10 <sup>-3</sup>	(BERESFORD et al., 2000)
Mestranol	5277,3	1,3 x 10 <sup>-2</sup>	(RUTISHAUSER et al., 2004)

*Continua*

*Continuação*

Tabela 3 – Valores de CE50 e Potência Relativa de composto orgânicos individuais analisados por ensaios baseados em gene repórter em leveduras

<b>Substância</b>	<b>CE50 (ng.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>PR</b>	<b>Referência</b>
Metoxicloro	-	$8 \times 10^{-4}$	(BERESFORD et al., 2000)
Nonilfenol	-	$4 \times 10^{-3}$	(BERESFORD et al., 2000)
	-	$3 \times 10^{-3}$	(BERESFORD et al., 2000)
	1850,94	$2,5 \times 10^{-5}$	(RUTISHAUSER et al., 2004)
	1542450	$1,8 \times 10^{-5}$	(BECK et al., 2006)
	-	$1,3 \times 10^{-5}$	(BRIX et al., 2010)
	-	$3,3 \times 10^{-6}$	(BRIX et al., 2010)
	5464,68	-	(BALSIGER et al., 2010)
	-	$1 \times 10^{-6}$	(CAJTHAML et al., 2009)
	-	$4,0 \times 10^{-6}$	(MURK et al., 2002)
	Octilfenol	-	$1,0 \times 10^{-5}$
6395920		$4,5 \times 10^{-6}$	(BECK et al., 2006)
5570,64		$7,8 \times 10^{-6}$	(RUTISHAUSER et al., 2004)
-		$4,0 \times 10^{-6}$	(MURK et al., 2002)
Triclosano	-	$1 \times 10^{-6}$	(CAJTHAML et al., 2009)

(-) Não informado

A potência relativa e a CE50 divergem inter e intralaboratorialmente, provavelmente por questões relacionadas às condições de realização do ensaio, demonstrando a importância da análise dessas substâncias em cada laboratório que tenha interesse de usar esse valor para estimar o percentual de atividade estrogênica da amostra complexa (seja ambiental ou solução de misturas) analisada.

Apesar das variações de resultados, fica evidente que os estrogênios possuem maior potência relativa, inclusive Jarosová et al. (2014) relacionaram esses compostos à maior contribuição para a atividade estrogênica em matrizes ambientais.

#### 2.3.1.4. Análise de misturas

Normalmente, os DE são encontrados em um complexo de misturas no meio ambiente, e alguns estudos mostram que a exposição à misturas de DE podem ocasionar efeitos indesejáveis que não são observados para o mesmo nível de concentração desses compostos individuais (ALTENBURGER et al., 2015; KORTENKAMP, 2014).

Por exemplo, Rajapakse et al. (2001) investigaram a mistura de 11 xenoestrogênios para determinar a influência desse conjunto de substâncias no efeito da atividade do E2, onde foi utilizado o ensaio YES e concentrações em um nível abaixo da concentração de efeito não observado de cada composto. O resultado mostrou que o efeito aditivo combinado dos 11 xenoestrogênios levou a um aumento da atividade do E2, mesmo quando cada composto estava presente abaixo da sua concentração de efeito não observado.

Misturas de DE podem apresentar potencial efeito sinérgico ou antagônico mesmo em baixas concentrações individuais, no entanto a estimativa e a previsão da atividade estrogênica de misturas químicas ainda são desafiadoras (SCHOLZE et al., 2014; YANG et al., 2015) e a avaliação toxicológica de DE naturais ou sintéticos ainda são predominantemente realizadas para substâncias individuais e não para um complexo de misturas (CONLEY et al., 2017; RAMIREZ et al., 2014).

Yu et al. (2019) avaliaram a influência de misturas de estrogênios sobre o efeito do EE2. Observaram efeitos aditivos para a mistura e a presença do EE2 não aumentou a atividade estrogênica em comparação com a mistura sem o EE2.

Jonker et al. (2005) e Loureiro et al. (2009) explicam que a interação entre diferentes compostos pode depender do nível de dosagem da mistura e/ou da razão da dose, de modo que o efeito da mistura pode variar de acordo com a concentração testada.

Desse modo, as concentrações encontradas no meio ambiente podem apresentar diferentes efeitos a depender do nível e da razão da dose do complexo de misturas presentes nas matrizes ambientais. E a demonstração de efeito em misturas, mesmo quando os compostos estão presentes abaixo da concentração de efeito não observado, embasa a necessidade de legislações que contemplem limites cada vez mais baixos, até mesmo abaixo da concentração de efeito não observado, para lançamentos de efluentes em corpos hídricos.

#### 2.3.1.5. Análise de amostras ambientais

A integração de bioensaios às análises de monitoramento de DE, em matrizes ambientais, tem sido bastante recomendada, pois os bioensaios possibilitam a análise do efeito das complexas misturas presentes no meio ambiente (TOUSOVA et al., 2017).

Geralmente, a resposta da análise da atividade estrogênica de amostras ambientais é dada em equivalente estradiol (EQ-E2) através da interpolação da curva da amostra com a curva da substância de referência do ensaio. Em alguns casos, a curva dose resposta da amostra não apresenta um paralelismo com a curva do controle do ensaio, ocasionando incerteza no cálculo do EQ-E2, porém não impedindo-o (WAGNER et al., 2013).

A Tabela 4 apresenta uma compilação de resultados de atividade estrogênica encontrada em diversas matrizes ambientais através de ensaios de ativação transcricional do ER em leveduras.

Tabela 4 – Atividade estrogênica de matrizes ambientais expressa em EQ-E2.

<b>Matriz Ambiental</b>	<b>Localização</b>	<b>EQ-E<sub>2</sub> (ng L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Referência</b>
Água potável	China	0,0352 – 1,5	(ZENG et al., 2013)
Água potável	China	<LD – 0,36	(XIAO et al., 2016)
Água residual	China	1228,5 – 1691,5	(LI et al., 2015)
Água superficial	Alemanha	11,9 – 19,4	(PAWLOWSKI et al., 2004)
Água superficial	Enseada de Jurujuba – Rio de Janeiro	<LD – 3,2	(NASCIMENTO et al., 2018)
Água superficial	Mar Báltico	0,01 – 0,8	(BECK et al., 2006)
Água superficial	Países Baixos	0 – 1,1	(MURK et al., 2002)
Água superficial	São Paulo, Brasil	0,13 – 3,1	(JARDIM et al., 2012)
Água superficial (fase dissolvida < 0,45 µm)	Rio Guandu – Rio De Janeiro, Brasil	<LD – 3,1	(DIAS et al., 2015)
Água superficial (fase dissolvida < 1,2 µm)	Rio Guandu – Rio De Janeiro, Brasil	<LD – 16	(DIAS et al., 2015)
Efluentes de ETE	América do Norte	≤1 – 15	(HUGGETT et al., 2003)
Efluentes de ETE	El Paso, Texas, EUA	0 – 28,4	(BALSIGER et al., 2010)
Efluentes de ETE	Canadá	≤1 – 4,5	(METCALFE et al., 2013)
Lodo biológico de esgoto	China	2,8 – 4,7 *	(RUAN et al., 2015)
Sedimento de rio	Itália	15,6 *	(VIGANÒ et al., 2008)

(\*) ng g<sup>-1</sup>

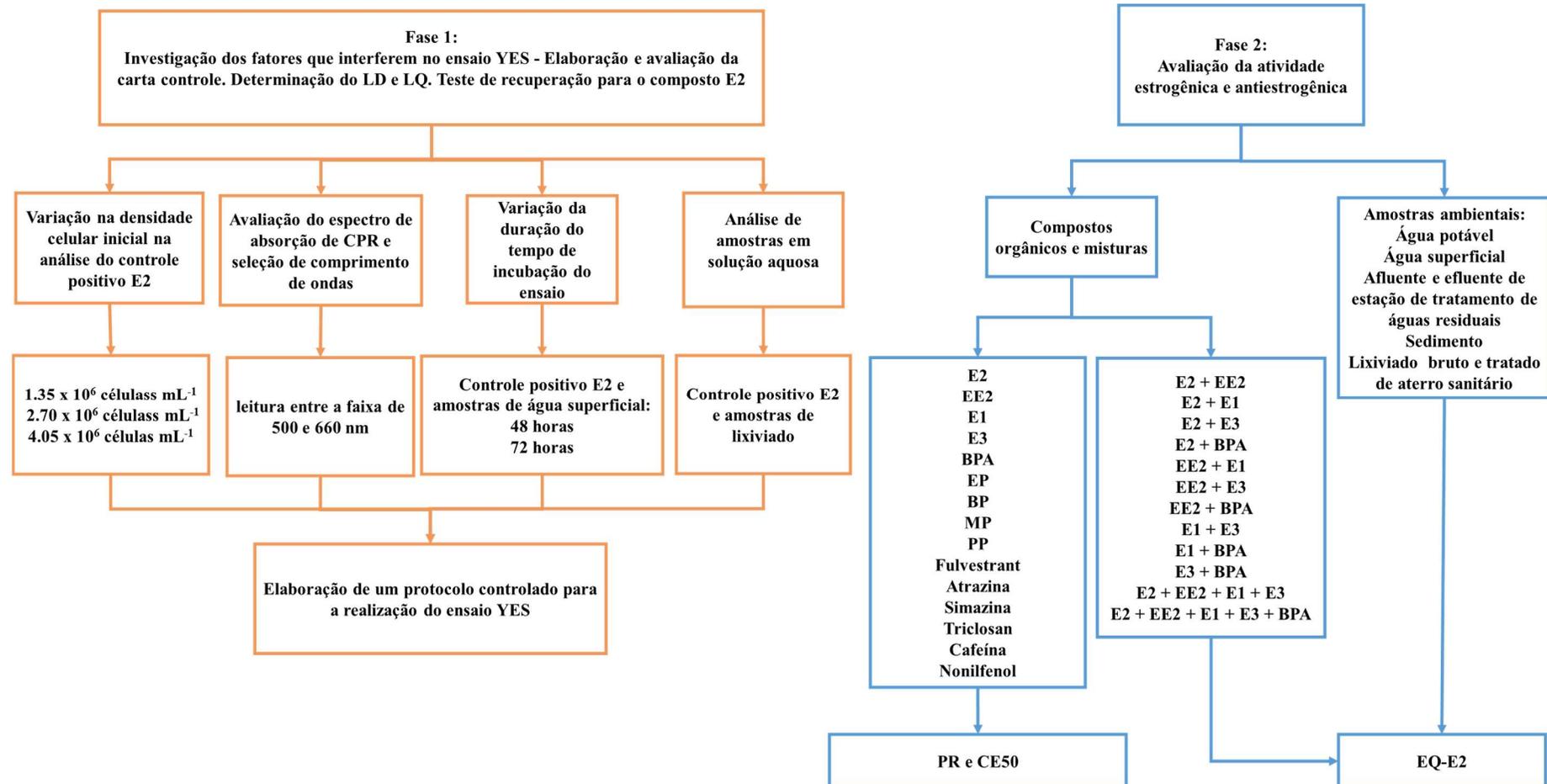
Mediante ao conhecimento existente, acerca da presença de compostos desreguladores endócrinos estrogênicos em matrizes ambientais e seus efeitos nocivos aos seres vivos, se torna importante o estudo de um bioensaio que possua um mecanismo específico para análise dos efeitos dos DE. Desse modo, esta tese com o objetivo de investigar, elucidar e mitigar interferências no ensaio YES, permitirá maior confiabilidade e segurança ao uso deste ensaio. Isso facilitará o monitoramento dos DE no meio ambiente e conseqüentemente auxiliará para a elaboração de concentrações limites para o lançamento desses compostos no meio.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Visão geral da metodologia**

O ensaio YES foi realizado seguindo o procedimento padrão descrito por Routledge e Sumpter (1996). No entanto, algumas modificações foram empregadas para avaliar o método e investigar a confiabilidade dos resultados visando alcançar as condições ótimas de realização do ensaio e a elaboração de um protocolo mais adequado para as matrizes ambientais. Tais modificações foram: variação da densidade celular, do tempo de incubação do ensaio e da seleção do comprimento de onda para a leitura da resposta do ensaio. Para isso, o presente trabalho foi dividido em duas fases: 1) investigação dos fatores que interferem no ensaio YES, com o estabelecimento da carta-controle, limites de detecção e de quantificação e teste de recuperação para o controle positivo E2; 2) avaliação da atividade estrogênica e antiestrogênica de amostras ambientais, compostos orgânicos e misturas (Figura 5). O APÊNDICE 1 contém as publicações alcançadas pelo grupo de pesquisa, estas abrangem os resultados dos experimentos com as modificações que foram realizadas para o ensaio YES nesta tese.

Figura 5 – Fluxograma geral das fases 1 e 2 realizadas neste estudo



Legenda: CPR: *chlorophenol red* – produto de degradação do substrato cromogênico CPRG (*Chlorophenol red-β-D-galactopyranoside*); LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; PR: potência relativa; CE50: concentração efetiva média; EQ-E2: equivalente estradiol; E2: 17β-estradiol; EE2: 17α-etinilestradiol; E1: estrona; E3: estriol; BPA: Bisfenol-A; EP: etilparabeno; BP: butilparabeno; MP: metilparabeno; PP: propilparabeno.

### 3.2. Materiais e reagentes

Todos os reagentes, incluindo os elementos do meio de cultivo e análise usados no ensaio YES, foram adquiridos pela Sigma-Aldrich® (pureza  $\geq 98\%$ ), exceto Chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside (CPRG) que foi adquirido da Merck®.

As mono soluções dos compostos orgânicos e as soluções das misturas foram preparadas em etanol absoluto (Tedia®, grau HPLC) e armazenadas a 4°C.

Para extração em fase sólida (EFS), hexano, metanol e acetona (grau HPLC) foram fornecidos pela Tedia e a água ultrapura foi obtida do sistema Milli-Q (Millipore®). O cultivo de leveduras e o ensaio YES foram realizados em frascos de cultura de células de 50 mL (K11-2050) e microplacas de 96 poços (K12-096), respectivamente, ambos adquiridos da Kasvi®. Para o preparo do meio de cultivo e de análise do ensaio YES se utilizou pipetas sorológicas graduadas descartáveis de 5, 10 e 50 mL (Kasvi®) e ponteiros de 10, 200 e 1000  $\mu$ L (Socorex®).

A filtração das amostras ambientais foi realizada com membranas de fibra de vidro de 0,7  $\mu$ m e membranas de nylon de 0,45  $\mu$ m, ambas adquiridas pela Millipore®. Os cartuchos utilizados para a extração em fase sólida foram: Strata-X (sorvente polimérico à base de estireno-divinilbenzeno com superfície modificada) e os cartuchos de limpeza Strata-SAX (sorvente à base de sílica), 500 mg/6 mL, ambos adquiridos pela Phenomenex®.

### 3.3. Ensaio Yeast Estrogen Screen (YES)

O procedimento foi desenvolvido de acordo com Routledge e Sumpter (1996) com a aplicação de modificações nas condições do ensaio, tais como densidade celular, tempo de incubação do ensaio e seleção do comprimento de onda para a leitura da resposta do ensaio. O ensaio é baseado na expressão de um receptor de estrogênio humano adicionado à levedura *Saccharomyces cerevisiae* (estirpe BJ1991). Na presença de substâncias estrogênicas, o receptor de estrogênio é ativado e um receptor do gene lac-Z é expresso, induzindo a produção e liberação da enzima  $\beta$ -galactosidase. A enzima excretada degrada o substrato cromogênico

CPRG em CPR, o que é observado por uma mudança de cor no meio de análise de amarelo para avermelhado. Portanto, é um ensaio colorimétrico, avaliado por espectrofotometria.

As soluções utilizadas no ensaio (meio mínimo, glicose, ácido L-aspártico, L-treonina, sulfato de cobre, vitamina, CPRG, meio de cultivo e meio de análise) foram preparadas de acordo com Routledge e Sumpter (1996) e estão apresentados no ANEXO 1.

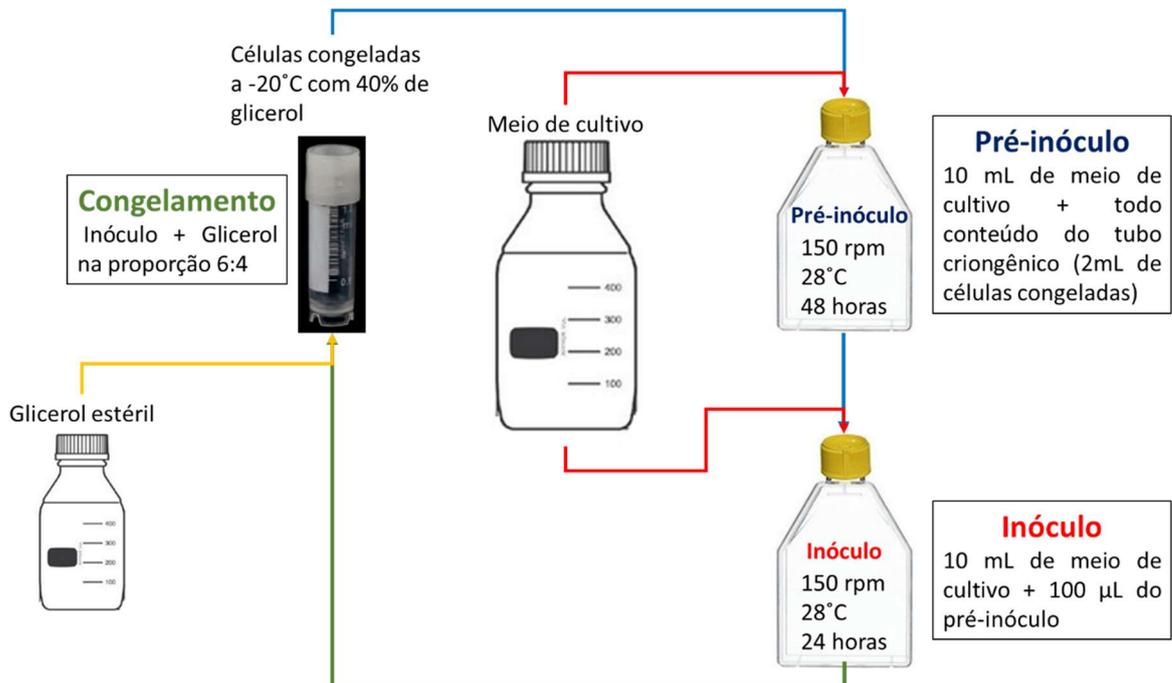
### 3.3.1. Cultivo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

A estirpe da levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada (BJ1991), desenvolvida pela Glaxo Group Research (Routledge e Sumpter, 1996) foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Controle da Poluição das Águas (COPPE/UFRJ).

As células de levedura foram mantidas congeladas à -20°C, em tubos criogênicos de 2 mL, contendo o inóculo (meio de cultivo + células) e glicerol na proporção de 6:4, (Figura 6). Previamente ao ensaio (72 horas), foi realizado o pré-inóculo descongelando a levedura e ressuspendendo todo o volume do tubo criogênico em 10 mL de meio de cultivo em um frasco de cultura de células de 50 mL. Este frasco foi mantido em incubadora de agitação orbital (modelo Q816M20, Quimis) à 28 °C e 150 rpm por 48 horas (Figura 6).

Na sequência, 24 horas antes do ensaio, foi realizado o inóculo da levedura, adicionando-se 10 mL de meio de cultivo e 100 µL do pré-inóculo em um novo frasco de cultivo. O mesmo foi mantido em incubação nas mesmas condições do pré-inóculo por 24 horas, até a realização do ensaio YES (Figura 6). Toda a manipulação da estirpe foi realizada em cabine de segurança biológica classe II A1 (Filterflux® SBIIA1), para evitar possíveis contaminações.

Figura 6 – Esquema da metodologia de preparo do congelamento, pré-inóculo e inóculo das células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*



### 3.3.2. Ensaio YES para avaliação da atividade estrogênica de compostos e amostras ambientais

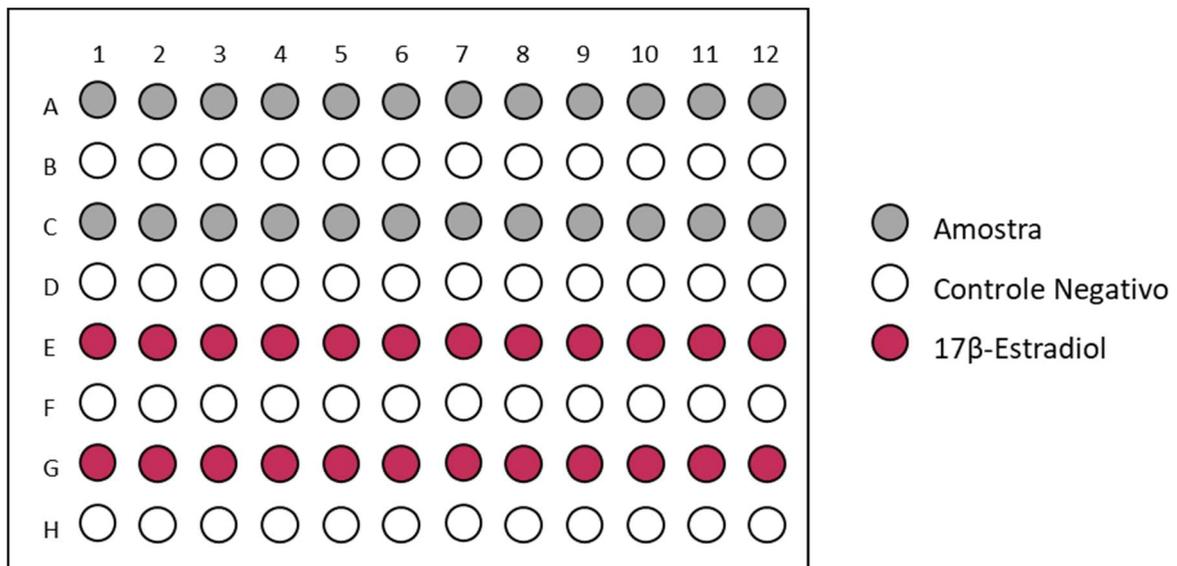
Assim como todo o procedimento com a levedura, os procedimentos na montagem do ensaio YES foram realizados na cabine de segurança biológica classe II A1 (Filterflux® SBIIA1) e com materiais estéreis descartáveis (placas, ponteiras, pipetas graduadas) ou esterilizados (frascos de vidro).

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços com fundo chato, onde cada linha foi ocupada por uma amostra ambiental, compostos orgânicos individuais ou misturas em 12 concentrações de diluição seriada, pelo controle negativo (somente etanol) ou pelo controle positivo (12 concentrações de diluição seriada do composto E2, variando de 2724 a  $1,33 \text{ ng L}^{-1}$  no poço). As diluições foram feitas em uma placa separada e destinada especificamente para tal, segundo o protocolo: (i) Adicionar 100  $\mu\text{L}$  de etanol (grau HPLC) em todos os poços de

uma fileira, à exceção do primeiro; (ii) Adicionar ao primeiro poço 200  $\mu\text{L}$  do extrato da amostra; (iii) Transferir 100  $\mu\text{L}$  do primeiro poço para o segundo e homogeneizar (realizado com a própria pipeta); (iv) Transferir 100  $\mu\text{L}$  do segundo poço para o terceiro e homogeneizar; (v) Continuar o procedimento até o último poço, que terá o volume final de 200  $\mu\text{L}$ .

Após a diluição, 10  $\mu\text{L}$  de cada poço foram transferidos em duplicata para a placa de ensaio, para serem evaporados dentro da cabine de segurança biológica. O procedimento foi realizado para todas as amostras e para o controle positivo. Para o controle negativo, 10  $\mu\text{L}$  de etanol (grau HPLC) foram adicionados diretamente para cada poço da linha correspondente. Para evitar uma contaminação cruzada, as fileiras das amostras foram intercaladas com as do controle negativo, tal como ilustrado na Figura 7.

Figura 7 – Exemplo de arranjo de amostras e controles (positivo E2 e negativo) na placa de 96 poços seguido no ensaio YES realizados nesse estudo



Com relação ao controle positivo 17 $\beta$ -Estradiol, utilizado para gerar a curva padrão que serviu de referência comparativa para todo o ensaio, sua diluição foi idêntica à das amostras. A solução estoque utilizada consistiu de 17 $\beta$ -Estradiol (> 98%, Sigma-Aldrich®) na concentração de 54,48  $\mu\text{g L}^{-1}$  em etanol (grau HPLC, Tedia®) e a faixa de concentrações da curva de 12 pontos gerada foi de 2724  $\text{ng L}^{-1}$  a 1,33  $\text{ng L}^{-1}$  no poço.

Com a evaporação dos 10  $\mu\text{L}$  transferidos para cada poço da placa de ensaio, restou apenas a massa das substâncias presente nas amostras. Então, 200  $\mu\text{L}$  do meio de análise contendo meio de cultivo, levedura ( $1,35 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) e CPRG ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) foram adicionados em cada poço da placa, cuidadosamente para que não houvesse contaminação cruzada. Em seguida, as placas foram fechadas, lacradas, agitadas por 2 minutos em um agitador de placas (marca IKA®, modelo MS-3) e levadas à estufa (Nova Ética 410). para incubação à  $30^\circ\text{C}$  por 72 horas.

Após o período de incubação, foi visível a mudança de coloração nos poços das amostras que apresentaram atividade estrogênica. Então, para o encerramento do ensaio foram lidas as absorbâncias nos comprimentos de onda 575 nm e 620 nm, para avaliar a cor e a turbidez, respectivamente, com o espectrofotômetro leitor de microplacas VersaMax (Molecular Devices®).

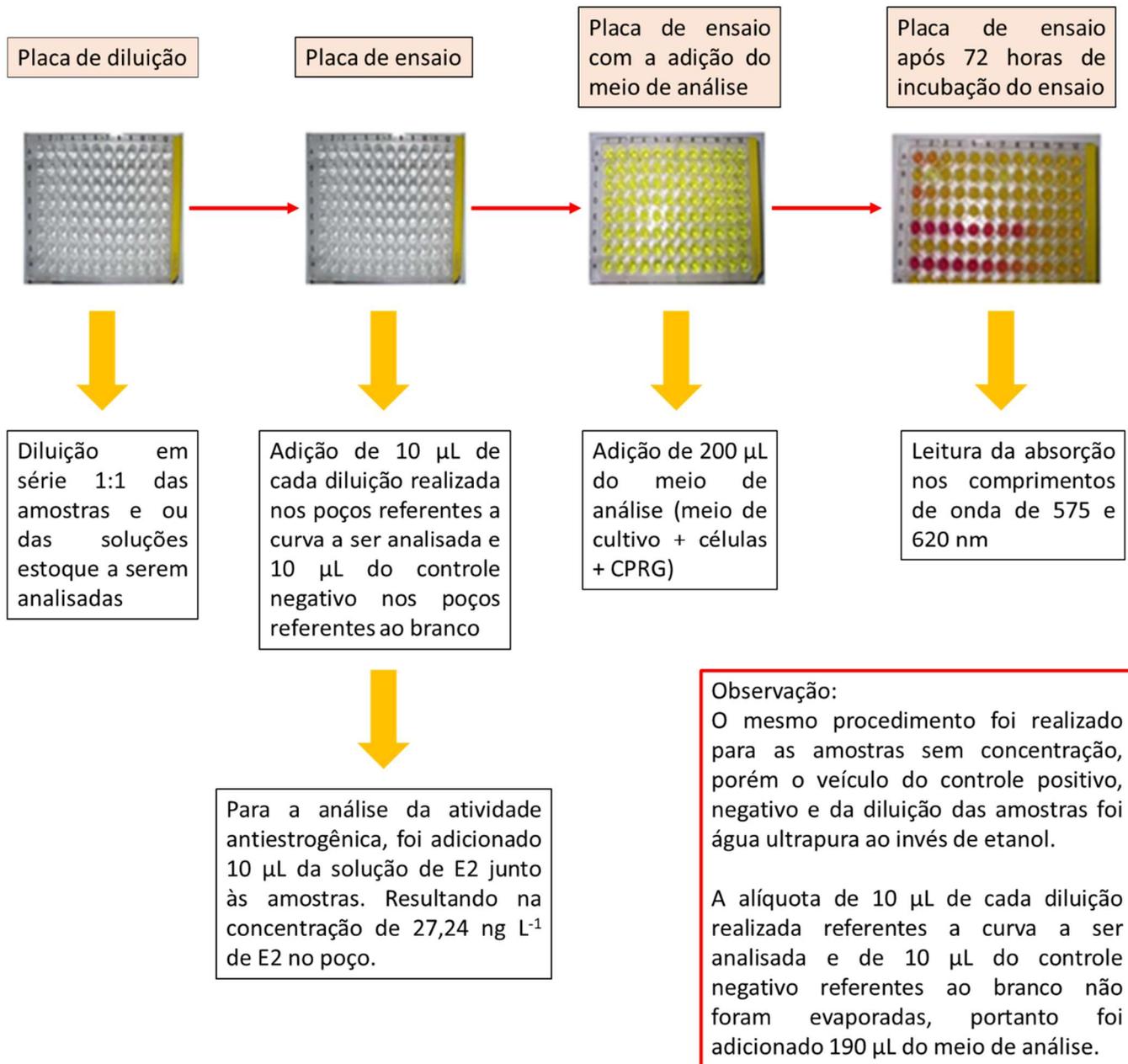
Todo esse procedimento foi realizado para amostras concentradas (extrato das amostras) ou para compostos orgânicos e misturas cujas soluções estoque foram preparadas em etanol (grau HPLC).

### 3.3.3. Ensaio YES para a avaliação da atividade antiestrogênica

A atividade antiestrogênica foi avaliada seguindo a metodologia de determinação de atividade estrogênica descrita no item 3.3.2. com adição de estradiol em todos os poços contendo as 12 diluições em série da amostra na placa de ensaio, resultando na concentração final de  $27,24 \text{ ng L}^{-1}$  de E2 em cada poço.

A Figura 8 apresenta um breve resumo das etapas de procedimento do ensaio YES para a análise de atividade estrogênica e antiestrogênica.

Figura 8 – Etapas de procedimento do ensaio YES para a análise de atividade estrogênica e antiestrogênica



### 3.4. Fase 1: Investigação e avaliação dos fatores que interferem na resposta do ensaio YES

#### 3.4.1. Curva de crescimento da levedura e curva de correlação entre densidade ótica e densidade celular

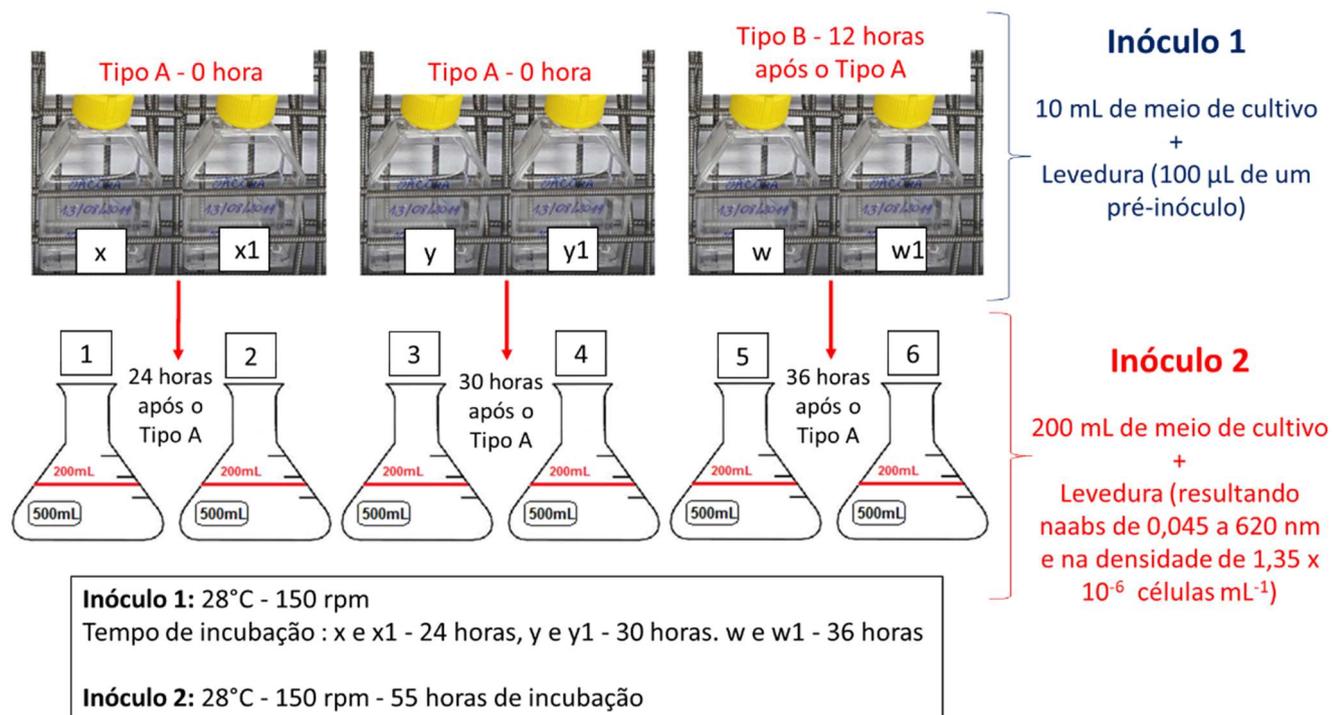
Para a elaboração da curva de crescimento da levedura, primeiramente foram realizados seis inóculos em frascos de cultura (chamados de Inóculo 1) seguindo a metodologia descrita no item 3.3.1. Foram feitos dois tipos de inóculos 1: tipo A e tipo B, onde havia uma diferença de 12 horas entre eles, sendo o tipo A 0 hora do ensaio de curva de crescimento da levedura e o tipo B 12 horas após o inóculo do tipo A. Foram preparadas 4 réplicas do tipo A (x e x1, y e y1) e 2 réplicas do tipo B (w e w1). Esses seis inóculos foram incubados a 28°C, 150 rpm. O tempo de incubação variou, para as duplicatas x e x1 foi de 24 horas, y e y1 30 horas e w e w1 36 horas (Figura 9).

Em seguida, as duplicatas foram homogeneizadas (x com x1, y com y1 e w com w1) e foram realizados seis novos inóculos em erlenmeyers esterelizados de 500 mL contendo 200 mL de meio de cultivo (Inóculo 2). A mistura do frasco x com o frasco x1, inoculou os erlenmeyers 1 e 2 (24 horas após o início do ensaio), frasco y com o y1 inoculou os erlenmeyers 3 e 4 (30 horas após o início do ensaio) e frasco w com o w1 inoculou os erlenmeyers 5 e 6 (36 horas após o início do ensaio) (Figura 9). A absorvância final de cada erlenmeyer foi de 0,045 à 620 nm, equivalente à  $1,35 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>.

Após cada inóculo 2, o erlenmeyer foi incubado a 28 °C, a 150 rpm. E a cada hora estipulada foi realizada a retirada de uma alíquota de 1 mL para a leitura da absorção a 620 nm no espectrofotômetro da marca Shimadzu®, modelo UV-1800 e foi correlacionada à contagem manual de células com a câmara de Neubauer e microscópio (Nikon®, modelo Eclipse E200). Para a contagem manual, utilizou-se o corante azul de metileno para a identificação das células vivas e mortas. Intercalou-se os horários de leitura das diferentes duplicatas de inóculos de modo a se ter as leituras de absorvância e a contagem manual do número de células de hora em hora por 55 horas. Ao fim foi construída a curva de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* juntando as leituras das duplicatas dos três tipos de inóculos 2.

Ao todo, foram 3 inóculos 2 em duplicatas realizados em diferentes dias e horários (24, 30 e 36 horas após o inóculo dos frascos tipo A – 0 hora do ensaio (Figura 9). Esse esquema de inoculação em diferentes horários foi para garantir o acompanhamento do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* durante 55 horas, com leituras a cada hora. Na Figura 9, é possível visualizar o esquema do ensaio com os horários de inoculação da estirpe *Saccharomyces cerevisiae* nos frascos de inóculo 1 e erlenmeyers de inóculo 2.

Figura 9 – Esquema dos inóculos (inóculo 1 e 2) para a elaboração da curva de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* – Tipo A foi o inóculo no início do ensaio - 0 hora, Tipo B – 12 horas após o inóculo Tipo A. As siglas x e x1 são duplicatas provenientes do tipo A e foram inoculadas nos erlenmeyers 1 e 2 (24 horas após o início do ensaio); y e y1 também são duplicatas provenientes do inóculo Tipo A e foram inoculados nos erlenmeyers 3 e 4 após decorridos 30 horas do início do ensaio e w e w1 são duplicatas provenientes do inóculo tipo B e foram inoculados nos erlenmeyers 5 e 6 após decorridos 36 horas do início do ensaio



Vale ressaltar que todo procedimento de pré-inóculo, inóculo e abertura dos erlenmeyers para retirada das alíquotas destinadas à leitura da absorbância e à contagem manual de células

foi realizado em cabine de segurança biológica. E as alíquotas retiradas da cabine para o registro da absorbância e da densidade celular foram descartadas, não retornando aos frascos.

Com as medições de absorbância (contagem indireta com o espectrofotômetro da marca Shimadzu®, modelo UV-1800) e de densidade celular em células mL<sup>-1</sup> (contagem direta com câmara de Neubauer e o microscópio - Nikon®, modelo Eclipse E200) construiu-se uma curva de correlação entre os dois métodos de contagem de células, possibilitando que para os futuros ensaios, pudesse adotar a contagem indireta.

#### 3.4.2. Variação na densidade celular inicial no ensaio

Foram realizados ensaios com três densidades celulares iniciais diferentes, ou seja, a densidade normalmente utilizada em nosso laboratório ( $1,35 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>), duas e três vezes a densidade celular usual ( $2,7 \times 10^6$  e  $4,05 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>). A câmara de Neubauer e o microscópio (Nikon®, modelo Eclipse E200) foram utilizados para a contagem manual de células e para a contagem de forma indireta utilizou-se o espectrofotômetro da marca Shimadzu®, modelo UV-1800, onde a absorção a 620 nm foi medida.

#### 3.4.3. Avaliação do espectro de absorção de CPR e seleção do comprimento de ondas

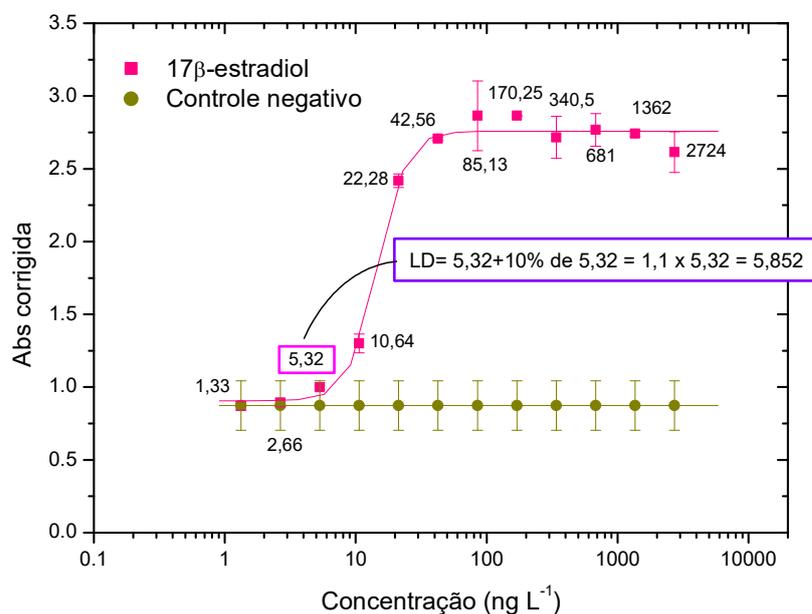
Após a realização do ensaio com a substância de referência E2 conforme item 3.3.2., foi realizada uma leitura em varredura, entre os comprimentos de onda 500 e 660 nm, com o espectrofotômetro de microplaca VersaMax (Molecular Devices®), a fim de verificar o melhor comprimento de onda de absorção para o CPR (produto de degradação do substrato cromogênico CPRG). As medidas de absorbância foram plotadas versus seus respectivos comprimentos de onda, e o comprimento de onda ideal para a leitura de cor do ensaio foi estabelecido para o procedimento de laboratório.

### 3.4.4. Carta controle, limites de detecção e quantificação do ensaio YES e teste de recuperação

A carta controle foi construída com base na curva dose-resposta do  $17\beta$ -estradiol e na CE50 derivada de cada ensaio. Uma carta controle foi estabelecida para cada 20 ensaios realizados, conforme ZAGATTO e BERTOLETTI (2008).

O limite de detecção (LD), isto é, a menor concentração detectável no ensaio, foi baseado na curva do E2 padrão realizada com 12 diluições em série 1: 1. O LD foi definido como 1,1 vezes a concentração imediatamente abaixo da menor diluição detectada de E2. O limite de quantificação (LQ) foi definido como 3 vezes o LD. Estes cálculos foram definidos em nosso laboratório após a observação das curvas sigmóides e da expressão da atividade estrogênica do controle positivo E2, onde, como margem de segurança, foi adicionado 10% do valor da concentração nominal imediatamente abaixo da menor diluição detectada de E2 para o cálculo do LD (Figura 10). Posteriormente, a concentração foi dividida pelo respectivo fator de concentração final da amostra e multiplicada pelo fator de diluição aplicado no ensaio. Os limites foram estabelecidos a cada 20 ensaios juntamente com a carta controle e, portanto, não foram fixados, havendo variação sazonal.

Figura 10 – Curva dose-resposta do controle positivo E2 para exemplificação do cálculo do limite de detecção do ensaio YES



Foi realizado o teste de recuperação, para a mono solução de E2, compreendendo os métodos de preparação da amostra (filtração + EFS + ensaio YES). Para isso, 1 L de água ultrapura foi dopado com duas diferentes concentrações: 2 e 12 ng L<sup>-1</sup>. Em seguida a água dopada foi filtrada e extraída conforme o item 3.5.2.1.1. e as membranas utilizadas na filtração foram extraídas conforme o item 3.5.2.1.2., onde foi descrito a extração com solvente assistida por ultrassom. Após a concentração e eluição, os extratos foram analisados conforme descrito no item 3.3.2. Um branco de laboratório composto por água ultrapura também foi submetido a todo o procedimento, a fim de avaliar a contaminação durante o processo. Todas as amostras foram preparadas e analisadas em duplicatas.

#### 3.4.5. Variação do tempo de incubação das placas no ensaio

A leitura do ensaio foi realizada de hora em hora durante as 72 horas de duração do ensaio. Para tanto, foram utilizadas três placas de 96 poços, cada uma contendo 6 réplicas da curva do E2 (linhas A, B, C, D, E e F da microplaca de 96 poços) e 24 réplicas do controle negativo (linhas G e H da microplaca de 96 poços). Onde, uma placa foi incubada a 30°C na leitora de microplacas VersaMax (Molecular Devices®) e duas placas foram incubadas a 30°C na estufa (Nova Ética 410) A leitora de microplacas foi configurada para realizar leituras de hora em hora e as placas foram trocadas após cada ciclo de 24 horas. Portanto, uma leitura de 72 horas foi obtida e as medições foram usadas para a construção de uma curva dose-resposta.

A estratégia das três placas foi aplicada porque uma incubação prévia de 72 h a 30°C no espectrofotômetro levou a placa à completa secura, uma vez que esta deve estar aberta para as leituras. Ressalta-se que a mesma diluição serial foi utilizada para todas as 6 curvas de E2, a fim de evitar erros de diluição (seja do operador ou da pipeta).

#### 3.4.6. Curva dose-resposta do controle positivo E2 em solução aquosa e análise de amostras não concentradas de lixiviado bruto de aterro sanitário

Para o estudo da interferência de amostras aquosas no ensaio YES, seguiu-se o mesmo procedimento de avaliação da atividade estrogênica citado no item 3.3.2. e na Figura 8, porém a solução estoque do controle positivo E2 foi preparada em água ultrapura, mas mantendo a mesma concentração de  $54.48 \mu\text{g L}^{-1}$ . Para as diluições das amostras e o controle negativo também se utilizou água ultrapura.

A solução aquosa de E2 foi preparada a partir de uma solução de E2 em etanol, onde retirou-se uma alíquota e dissolveu-se em água ultrapura para atingir a concentração desejada ( $54.48 \mu\text{g L}^{-1}$  – 0,1% etanol). Esta metodologia foi escolhida devido à melhor solubilização do E2 em etanol do que em água. Esta solução aquosa foi sempre preparada imediatamente antes da realização do ensaio e não foi reaproveitada para ensaios posteriores.

O controle positivo E2 foi analisado em solução aquosa para que se pudesse analisar amostras sem a realização das etapas de filtração e extração em fase sólida, onde as amostras não foram eluídas em solvente, necessitando que o veículo do controle positivo, da diluição e do controle negativo fossem o mesmo que o da amostra a ser analisada.

Foram analisadas amostras ambientais de lixiviado bruto de aterro sanitário e para a montagem da placa de ensaio realizou-se a diluição conforme explicado no item 3.3.2., em seguida 10  $\mu\text{L}$  de cada poço foram transferidos em duplicata para a placa de ensaio, porém não houve a evaporação e foi adicionado 190  $\mu\text{L}$  de meio de análise em vez de 200  $\mu\text{L}$  como foi feito quando se deixa evaporar o solvente. O procedimento foi realizado para todas as amostras e para o controle positivo. Para o controle negativo, 10  $\mu\text{L}$  de água ultrapura foram transferidos diretamente para cada poço da linha correspondente.

### 3.5. Fase 2: Avaliação da atividade estrogênica e antiestrogênica de compostos orgânicos, misturas e matrizes ambientais

#### 3.5.1. Atividade estrogênica de compostos orgânicos e suas misturas

As soluções estoque dos compostos analisados foram preparadas em etanol absoluto (Tedia®, grau de HPLC) como apresentado na Tabela 5. Diferentes intervalos de concentração foram testados para compostos orgânicos até que uma curva sigmoideal fosse alcançada no ensaio. Misturas de estrogênios e bisfenol-A também foram testadas na mesma e em uma concentração mais baixa que a desses compostos orgânicos avaliados individualmente. Foram realizadas quatro baterias de ensaios com duas repetições de cada mistura. Foram utilizadas concentrações equipotentes de razão fixa, que seguiram o procedimento descrito no item 3.3.2. para a diluição seriada.

Tabela 5 – Compostos orgânicos e misturas analisadas com suas respectivas concentrações (soluções estoque e faixa de concentração testada no ensaio)

<b>Compostos orgânicos/Misturas</b>	<b>Concentração da solução estoque (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Faixa de concentração testada (<math>\text{ng L}^{-1}</math>)<sup>a</sup></b>
17 $\beta$ -estradiol (E2)	54,48	1,33 – 2,724 x 10 <sup>3</sup>
17 $\alpha$ -ethinilestradiol (EE2)	54,48	1,33 – 2,724 x 10 <sup>3</sup>
Estrona (E1)	150	3,66 – 7,50 x 10 <sup>3</sup>
Estriol (E3)	1,00 x 10 <sup>5</sup>	2,44 x 10 <sup>3</sup> – 5,00 x 10 <sup>6</sup>
Bisfenol-A (BPA)	4,95 x 10 <sup>5</sup>	1,21 x 10 <sup>3</sup> – 2,48 x 10 <sup>7</sup>
Etilparabeno (EP)	3,50 x 10 <sup>6</sup>	8,55 x 10 <sup>3</sup> – 1,75 x 10 <sup>8</sup>

*Continua*

*Continuação*

Tabela 5 – Compostos orgânicos e misturas analisadas com suas respectivas concentrações (soluções estoque e faixa de concentração testada no ensaio)

<b>Compostos orgânicos/Misturas</b>	<b>Concentração da solução estoque (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Faixa de concentração testada (<math>\text{ng L}^{-1}</math>)<sup>a</sup></b>
Butilparabeno (BP)	$1,00 \times 10^6$	$2,44 \times 10^4 - 5,00 \times 10^7$
Metilparabeno (MP)	$3,50 \times 10^6$	$8,55 \times 10^4 - 1,75 \times 10^8$
Propilparabeno (PP)	$1,00 \times 10^6$	$2,44 \times 10^4 - 5,00 \times 10^7$
Fulvestrant (ICI 182,780)	$6,00 \times 10^4$	$3,00 \times 10^6 - 1,46 \times 10^3$ <sup>b</sup>
Atrazina	$1,00 \times 10^4$	$5,00 \times 10^5 - 2,44 \times 10^2$ <sup>c</sup>
Simazina	$1,00 \times 10^4$	$5,00 \times 10^5 - 2,44 \times 10^2$
Triclosan	$1,00 \times 10^4$	$5,00 \times 10^5 - 2,44 \times 10^2$ <sup>c</sup>
Cafeína	$1,00 \times 10^4$	$5,00 \times 10^5 - 2,44 \times 10^2$ <sup>c</sup>
Nonilfenol	100	$2,44 - 5,00 \times 10^3$
E2 + EE2	E2: 54,48	E2: $1,33 - 2,724 \times 10^3$
	EE2: 54,48	EE2: $1,33 - 2,724 \times 10^3$
E2 + E1	E2: 54,48	E2: $1,33 - 2,724 \times 10^3$
	E1: 150	E1: $3,66 - 7,50 \times 10^3$
E2 + E3	E2: 54,48	E2: $1,33 - 2,724 \times 10^3$
	E3: $1,00 \times 10^5$	E3: $2,44 \times 10^3 - 5,00 \times 10^6$
E2 + BPA	E2: 54,48	E2: $1,33 - 2,724 \times 10^3$
	BPA: $4,95 \times 10^5$	BPA: $1,21 \times 10^4 - 2,48 \times 10^7$

*Continua*

*Continuação*

Tabela 5 – Compostos orgânicos e misturas analisadas com suas respectivas concentrações (soluções estoque e faixa de concentração testada no ensaio)

<b>Compostos orgânicos/Misturas</b>	<b>Concentração da solução estoque (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Faixa de concentração testada (<math>\text{ng L}^{-1}</math>)<sup>a</sup></b>
EE2 + E1	EE2: 54,48	EE2: $1,33 - 2,724 \times 10^3$
	E1: 150	E1: $3,66 - 7,50 \times 10^3$
EE2 + E3	EE2: 54,48	EE2: $1,33 - 2,724 \times 10^3$
	E3: $1,00 \times 10^5$	E3: $2,44 \times 10^3 - 5,00 \times 10^6$
EE2 + BPA	EE2: 54,48	EE2: $1,33 - 2,724 \times 10^3$
	BPA: $4,95 \times 10^5$	BPA: $1,21 \times 10^4 - 2,48 \times 10^7$
E1 + E3	E1: 150	E1: $3,66 - 7,50 \times 10^3$
	E3: $1,00 \times 10^5$	E3: $2,44 \times 10^3 - 5,00 \times 10^6$
E1 + BPA	E1: 150	E1: $3,66 - 7,50 \times 10^3$
	BPA: $4,95 \times 10^5$	BPA: $1,21 \times 10^4 - 2,475 \times 10^7$
E3 + BPA	E3: $1,00 \times 10^5$	E3: $2,44 \times 10^3 - 5,00 \times 10^6$
	BPA: $4,95 \times 10^5$	BPA: $1,208 \times 10^4 - 2,475 \times 10^7$
E2 + EE2 + E1 + E3	E2: 54,48	E2: $1,33 - 2,724 \times 10^3$
	EE2: 54,48	EE2: $1,33 - 2,724 \times 10^3$
	E1: 150	E1: $3,66 - 7,500 \times 10^3$
	E3: $1,00 \times 10^5$	E3: $2,44 \times 10^3 - 5,00 \times 10^6$

*Continua*

*Continuação*

Tabela 5 – Compostos orgânicos e misturas analisadas com suas respectivas concentrações (soluções estoque e faixa de concentração testada no ensaio)

<b>Compostos orgânicos/Misturas</b>	<b>Concentração da solução estoque (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Faixa de concentração testada (<math>\text{ng L}^{-1}</math>)<sup>a</sup></b>
E2 + EE2 + E1 + E3 + BPA	E2: 54,48	E2: $1,33 - 2,724 \times 10^3$
	EE2: 54,48	EE2: $1,33 - 2,724 \times 10^3$
	E1: 150	E1: $3,66 - 7,500 \times 10^3$
	E3: $1,00 \times 10^5$	E3: $2,44 \times 10^3 - 5,00 \times 10^6$
	BPA: $4,95 \times 10^5$	BPA: $1,208 \times 10^4 - 2,475 \times 10^7$

<sup>a</sup> Intervalo de concentração na placa de ensaio que resultou em uma curva sigmoideal.

<sup>b</sup> As concentrações testadas expressaram atividade estrogênica, mas a curva sigmoideal não foi alcançada.

<sup>c</sup> As concentrações testadas não expressaram atividade estrogênica

### 3.5.2. Amostras ambientais

A Tabela 6 apresenta as amostras ambientais analisadas, todas coletadas no estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil. Diferentes quantidades de amostra foram coletadas e analisadas, dependendo da matriz: água potável (1 L), água superficial (1 L), afluentes e efluentes de estação de tratamento de esgoto (ETE) (500 mL), sedimentos de rio, estuário e praia (10 g), lixiviado bruto e tratado de aterro sanitário (30 mL). Essa variação do volume analisado se deve às características inerentes à cada matriz, uma vez que diferentes concentrações de xenoestrogênios e interferentes exigem abordagens de amostragem e fatores de concentração específicos.

As amostras foram coletadas em frascos de vidro âmbar, previamente descontaminados, e armazenadas a 4° C. As amostras aquosas foram acidificadas a pH 2 com HCl, a fim de garantir a preservação dos analitos.

Tabela 6 – Descrição das amostras, método de preparação aplicado e *endpoint* avaliado (estrogênico/antiestrogênico)

<b>Matriz ambiental</b>	<b>Ano de coleta</b>	<b>n</b>	<b>Descrição do local de amostragem</b>	<b>Volume/ massa analisada</b>	<b>Material dissolvido (Método 1)</b>	<b>Material particulado (Método 2)</b>	<b>Extrato de Sedimento (Método 3)</b>	<b>Amostras não concentradas (Método 4)</b>
Água potável (AP)	2015	21	Torneira, a 2 km da ETA localizada na região metropolitana do Rio de Janeiro	1 L	E (n = 21) A (n = 6)	-	-	-
Água superficial (AS)	2015	54	Rio usado como fonte de água para ETA pública que abastece 9 milhões de pessoas.	1L	E (n = 54) A (n = 6)	-	-	-
	2018	4	Córrego urbano impactado por esgoto da cidade do Rio de Janeiro.	1L	E (n = 4)	E (n = 4)	-	-
Afluente da ETE (AF)	2016	9	ETE localizada na cidade do Rio de Janeiro, com capacidade de tratamento de 210 L s <sup>-1</sup>	500 mL	E (n = 9)	-	-	-
Efluente da ETE (EF)	2016	8	– lodo ativado de aeração prolongada	500 mL	E (n = 8)	-	-	-

*Continua*

Continuação

Tabela 6 – Descrição das amostras, método de preparação aplicado e *endpoint* avaliado (estrogênico/antiestrogênico)

<b>Matriz ambiental</b>	<b>Ano de coleta</b>	<b>n</b>	<b>Descrição do local de amostragem</b>	<b>Volume/ massa analisada</b>	<b>Material dissolvido (Método 1)</b>	<b>Material particulado (Método 2)</b>	<b>Extrato de Sedimento (Método 3)</b>	<b>Amostras não concentradas (Método 4)</b>
Sedimento (S)	2016	10	Rio urbano com elevada captação de esgoto	10 g	-	-	E (n = 10)	-
Sedimento	2015 e 2018	18	Praias da Baía de Guanabara e da cidade de Angra dos Reis.	10 g	-	-	E (n = 18)	-
Lixiviado bruto de aterro sanitário (LB)	2015, 2017 e 2018	7	Aterro sanitário em operação desde 2011 com capacidade de recebimento de 12.000 toneladas de resíduos sólidos urbanos por dia	30 mL	E (n = 7) A (n = 4)	E (n = 4)	-	E (n = 4)
	2015	1	Aterro sanitário em operação desde 2003 com capacidade de recebimento de 5.000 toneladas de resíduos sólidos urbanos por dia	30 mL	E (n = 1)	-	-	-

Continua

Continuação

Tabela 6 – Descrição das amostras, método de preparação aplicado e *endpoint* avaliado (estrogênico/antiestrogênico)

<b>Matriz ambiental</b>	<b>Ano de coleta</b>	<b>n</b>	<b>Descrição do local de amostragem</b>	<b>Volume/ massa analisada</b>	<b>Material dissolvido (Método 1)</b>	<b>Material particulado (Método 2)</b>	<b>Extrato de Sedimento (Método 3)</b>	<b>Amostras não concentradas (Método 4)</b>
Lixiviado tratado de aterro sanitário (LT)	2015	1	Aterro sanitário em operação desde 2003 com capacidade de recebimento de 5.000 toneladas de resíduos sólidos urbanos por dia. Tratamento físico-químico + ultrafiltração e nanofiltração	30 mL	E (n = 1)	-	-	-

(E) atividade estrogênica avaliada

(A) atividade antiestrogênica avaliada

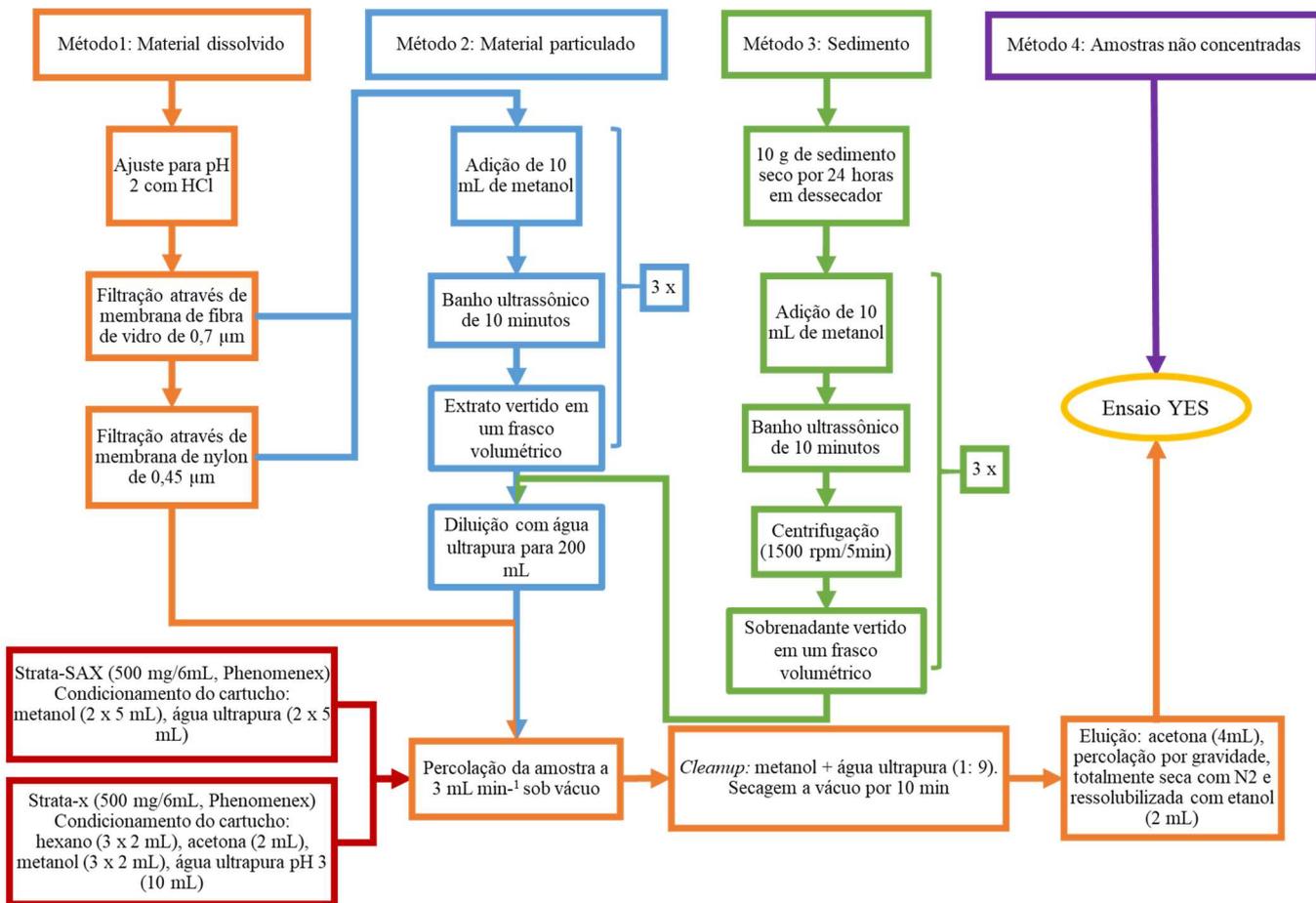
(n) número de amostras

Nota: Os métodos de preparo das amostras serão explicados no item 3.5.2.1

### 3.5.2.1. Preparo das amostras

Etapas específicas para a preparação das amostras foram realizadas, incluindo filtrações, extração em fase sólida (EFS) e extração com solvente assistida por ultrassom, conforme os métodos mostrados na Figura 11 e descritos a seguir (Métodos 1, 2, 3 e 4).

Figura 11 – Fluxograma das etapas dos métodos empregados para a preparação de amostras ambientais para a realização do ensaio YES



Nota: O cartucho Strata-SAX foi acoplado ao Strata-X para a remoção de possíveis interferentes das amostras de sedimento, lixiviado bruto e tratado de aterro sanitário, afluyente e efluente de ETE. O cartucho Strata-X foi utilizado para todas as amostras ambientais que foram concentradas.

### 3.5.2.1.1. Método 1: Material dissolvido

As amostras aquosas foram previamente filtradas através de membranas de fibra de vidro de 0,70  $\mu\text{m}$  (Millipore) e membrana de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore), exceto para água potável, que não foi filtrada devido à sua baixa concentração de sólidos suspensos totais ( $< 0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ).

O material dissolvido foi concentrado por EFS, realizado em sistema de manifold a vácuo com vazão de  $3 \text{ mL min}^{-1}$ . Os cartuchos Strata-X foram condicionados com 3 x 2 mL de hexano, 2 mL de acetona, 3 x 2 mL de metanol e 2 x 5 mL de água ultrapura ajustada para pH 3 com HCl. A percolação das amostras filtradas foi realizada sob vácuo e seguida de *clean up* com 10 mL de metanol + água ultrapura (1: 9) para a remoção dos possíveis interferentes.

Para os extratos de afluente e efluente de ETE, sedimento e lixiviado de aterro sanitário um cartucho de limpeza Strata-SAX foi acoplado na parte superior do cartucho Strata-X (Figura 12), de modo que a amostra fosse percolada pelos dois cartuchos em série. O cartucho Strata-SAX foi condicionado com 2 x 5 mL de metanol e 2 x 5 mL de água ultrapura. Este condicionamento foi realizado antes da conexão dos dois cartuchos e somente após o condicionamento individual dos cartuchos foi realizado o acoplamento (Figura 12) para a percolação das amostras.

Figura 12 – Foto do cartucho Strata-SAX acoplado ao Strata- X para remoção dos interferentes, durante a realização da EFS, das amostras de afluente e efluente de ETE, sedimento e lixiviado de aterro sanitário



A eluição dos analitos do cartucho Strata-X foi realizada com 2 x 2 mL de acetona percolada por gravidade e os cartuchos de Strata-SAX utilizados foram descartados. Os eluatos foram então secos sob uma corrente suave de nitrogênio até a evaporação completa do solvente. Finalmente, os analitos foram ressolubilizados com 2 mL de etanol para serem submetidos ao ensaio YES.

#### 3.5.2.1.2. Método 2: Material particulado

O material particulado das amostras aquosas retido nas membranas de filtração foi analisado separadamente. Portanto, duas frações de tamanho de material particulado foram processadas: partículas entre 0,45  $\mu\text{m}$  e 0,70  $\mu\text{m}$  ( $< 0,70 \mu\text{m}$ ) e partículas maiores que 0,70  $\mu\text{m}$  ( $> 0,70 \mu\text{m}$ ).

Membranas com sólidos em suspensão foram submetidas à extração com solvente assistida por ultrassom, onde três ciclos de banho ultrassônico de 10 minutos foram realizados com 10 mL de metanol cada. Os extratos foram diluídos com água ultrapura para um volume final de 200 mL e a EFS foi realizada conforme descrito em 3.5.2.1.1.

#### 3.5.2.1.3. Método 3: Sedimento

Antes da extração, alíquotas de 10 g de sedimentos foram pesadas e secas em dessecador por 24 h. A extração com solvente assistida por ultrassom foi realizada conforme descrito em 3.5.2.1.2. com uma etapa de centrifugação adicional para a retirada do sobrenadante. Após cada um dos três ciclos, as amostras com solvente foram centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos e os sobrenadantes foram coletados e diluídos com água ultrapura até um volume final de 200 mL e a EFS foi realizada conforme descrito em 3.5.2.1.1.

#### 3.5.2.1.4. Método 4: Amostras não concentradas

Algumas amostras de lixiviado provenientes de aterro sanitário foram testadas sem nenhum processo de concentração, considerando sua elevada concentração de xenoestrogênios. Neste caso, as amostras foram simplesmente acidificadas a pH 2 com HCl e submetidas ao ensaio YES.

### 3.6. Expressão dos resultados

A partir das leituras de absorvância, os dados foram analisados em termos de absorvância corrigida (Eq. 1).

$$Abs_{corr}(\text{amostra}) = Abs_{575}(\text{amostra}) - (Abs_{620}(\text{amostra}) - Abs_{620}(\text{controle negativo})) \quad \text{Eq. 1}$$

As curvas de dose-resposta foram traçadas com o software Origin® 6.0 (OriginLab), usando absorvâncias médias corrigidas versus concentrações em escala logarítmica (em ng L<sup>-1</sup> para compostos orgânicos e porcentagem para extratos de amostras ambientais e misturas). Curvas padrão do controle positivo E2 e outros compostos orgânicos foram ajustados a uma função logística simétrica.

Equivalentes de estradiol (EQ-E2) de amostras ambientais foram obtidos em ng L<sup>-1</sup> através da interpolação entre a curva dose-resposta do controle E2 e os dados das amostras, utilizou-se o modelo logístico apresentado na Equação 2.

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

Onde  $A_1$  e  $A_2$  são para os valores de absorvância corrigida máxima e mínima da curva E2 ajustada,  $x_0$  é a CE50 para E2 em  $\text{ng L}^{-1}$ ,  $p$  é a inclinação da curva sigmoidal e  $(x, y)$  é o par ordenado relacionado a uma concentração de amostra e sua resposta na absorvância corrigida.

O EQ-E2 ficou sendo o menor  $y$  (absorvância), que elucidou uma resposta agonista, multiplicado pelo fator de diluição (FD) usado no ensaio e dividido pelo fator de concentração (FC) da EFS (Eq. 3). Para o FC foi considerado o volume da amostra de cada matriz apresentado na Tabela 5.

$$\text{EQ} - \text{E2} = \frac{y \cdot \text{FD}}{\text{FC}} \quad \text{Eq. 3}$$

Os resultados do material dissolvido e particulado foram apresentados em  $\text{ng L}^{-1}$ , enquanto os sedimentos em  $\text{ng g}^{-1}$ . Os resultados da atividade antiestrogênica foram expressos qualitativamente, a partir da redução da expressão da atividade estrogênica na amostra com a adição do padrão E2.

A atividade estrogênica dos compostos orgânicos foi derivada de suas potências relativas (PR), que é definida como a razão entre a CE50 do E2 e a CE50 da substância analisada (Eq. 4).

$$\text{PR} = \frac{\text{CE50}_{(17\beta\text{-estradiol})}}{\text{CE50}_{(\text{substância})}} \quad \text{Eq. 4}$$

A citotoxicidade, ou seja, a inviabilização ou a inibição do crescimento das células de levedura ocasionadas pela amostra foi avaliada e quantificada através da absorvância a 620 nm, seguindo a Eq. 5, conforme proposto por Frische et al. (2009).

$$\text{Citotoxicidade} = 1 - \left( \frac{\text{Abs}_{620}(\text{amostra})}{\text{Abs}_{620}(\text{controle negativo})} \right) \quad \text{Eq. 5}$$

Os valores negativos e nulos foram interpretados como ausência de toxicidade, enquanto os valores positivos indicaram inibição do crescimento da levedura e foram expressos em porcentagem.

A análise de mistura foi realizada comparando o EQ-E2 observado e o valor estimado, definido como a soma das concentrações do composto (C) multiplicado por suas respectivas potências relativas (PR) referentes ao dia em que o ensaio foi realizado (Eq. 6). Para este cálculo foi utilizada a menor concentração analisada que apresentou atividade estrogênica, podendo ocorrer variações de acordo com a sensibilidade do ensaio obtida no dia da análise.

$$EQ - E2_{estim} = \sum C_{substância} \times PR_{substância} \quad \text{Eq. 6}$$

Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) com o software livre RStudio® (RStudio Team) para verificar diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os valores de EQ-E2 observados e estimados no ensaio de misturas.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Fase 1: Investigação e avaliação dos fatores que interferem no ensaio YES

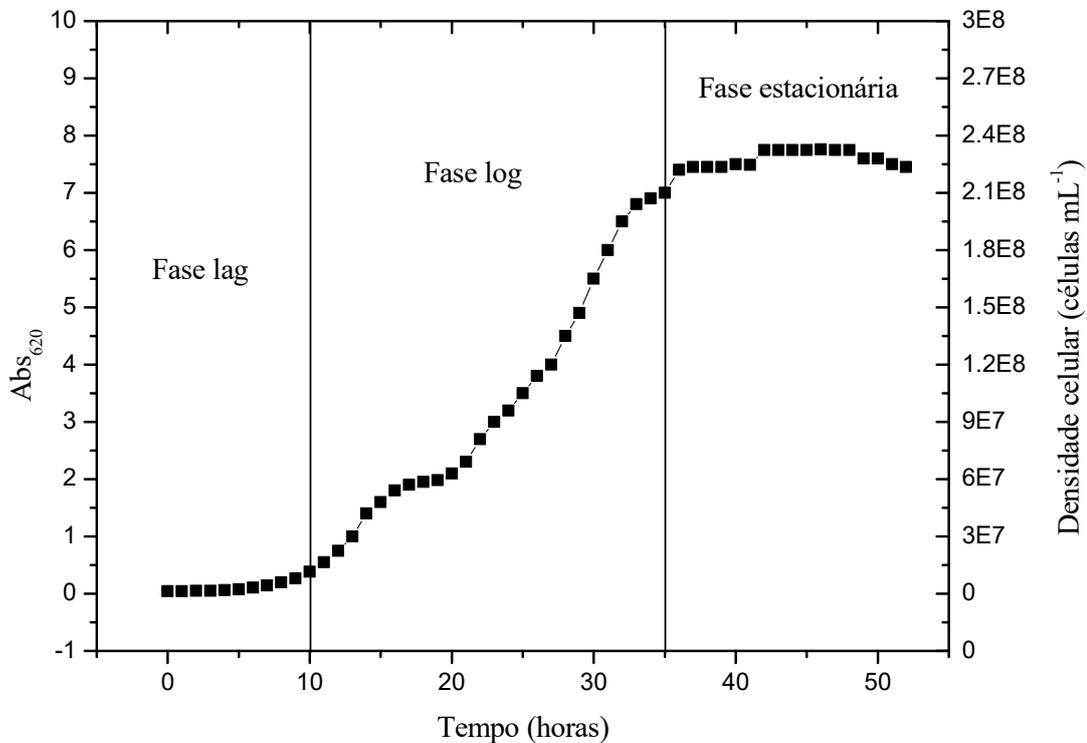
#### 4.1.1. Curva de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e curva de correlação entre densidade ótica e densidade celular

A primeira etapa para a implementação do ensaio YES é o cultivo da estirpe de levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada, portanto, o conhecimento sobre sua curva de crescimento é essencial. Algumas condições experimentais pré-estabelecidas, como temperatura, velocidade de agitação, concentração e pureza dos reagentes utilizados no cultivo, assim como o tempo de armazenamento da estirpe congelada podem interferir no crescimento celular.

Vale ressaltar que, conforme explicitado na metodologia, todos os reagentes e solventes usados no cultivo da levedura e no ensaio devem ser de alta pureza (grau HPLC para solventes e > 98% de pureza para reagentes sólidos) e a água deve ser ultrapura e livre de estrogênio. Estas condições são irrefutáveis para a implementação do ensaio. Além disso, é apropriado o uso de materiais descartáveis, estéreis e livres de substâncias estrogênicas, bem como vidrarias descontaminadas. Caso contrário, podem ocorrer resultados falso-positivos, principalmente com o uso de reagentes e solventes de baixa pureza que podem levar a respostas positivas no ensaio, inclusive no controle negativo.

A densidade celular inicial para a elaboração da curva de crescimento foi  $1,35 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>, que é a mesma densidade inicial de células estabelecida para a realização do ensaio YES neste estudo. Para a elaboração desta curva, foi realizado o inóculo e em seguida foi analisada a densidade celular e a absorbância a 620 nm por 55 horas de crescimento (Figura 13).

Figura 13 – Curva de crescimento obtida a partir do inóculo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (estirpe BJ1991) – Condições experimentais: Densidade celular inicial do inóculo:  $1,35 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ , temperatura:  $28^\circ\text{C}$  e rotação: 150 rpm, tempo de crescimento: 55 horas



A fase logarítmica foi a fase definida para semear o meio de análise, uma vez que as células crescem exponencialmente nesta fase, o que garante sua capacidade de reprodução e crescimento durante a incubação do ensaio. Portanto, células cultivadas por 24 horas foram usadas para a inoculação no meio de análise dos ensaios. Pequenas variações de tempo de inóculo ( $\pm 4$  horas) foram aceitas, desde que as células ainda estivessem dentro da fase logarítmica de crescimento.

A origem das células, que pode ser de uma cultura estoque congelada (seja de um meio líquido ou sólido), ou de um inóculo com células obtidas de um pré-inóculo, influencia na curva de crescimento de levedura. Quando o inóculo é iniciado a partir de uma cultura congelada, demora mais horas para atingir a fase de crescimento exponencial, portanto, dois inóculos sucessivos (chamados de pré-inóculo e inóculo) são recomendados antes de semear o meio de

análise para o ensaio. Idealmente, o pré inóculo cresce durante 48 h e o inóculo cresce durante as 24 h que precedem o ensaio.

Para contabilizar a densidade de células semeadas, pode-se realizar uma contagem manual direta por microscopia com câmara de Neubauer ou, alternativamente, uma contagem indireta por medidas de absorvância a 620 nm, que está associada à turbidez celular.

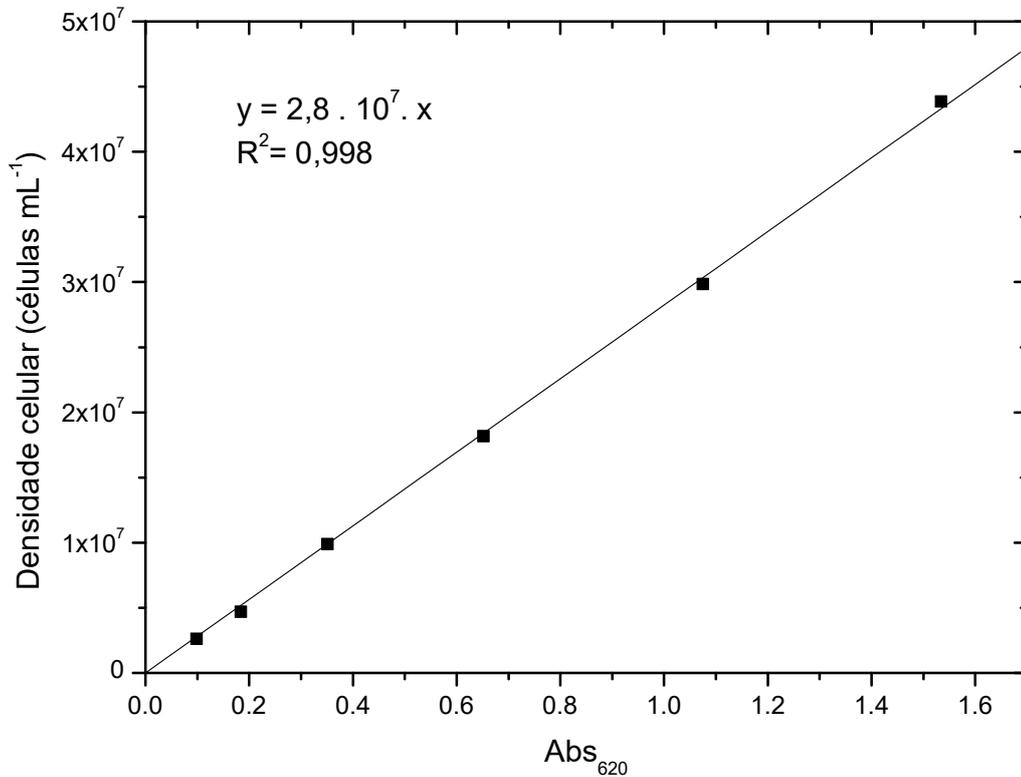
A contagem direta é mais trabalhosa, demanda mais tempo e pode apresentar várias fontes de erros, como pipetas ou câmaras mal calibradas, ajuste deficiente da lamínula, adsorção de células à pipeta, distribuição heterogênea na câmara, falta de experiência do operador e amostragem não representativa das células em suspensão (LOURENÇO, 2006).

Por outro lado, a contagem indireta é bem estabelecida e baseia-se no uso da densidade óptica, por meio da obstrução física da passagem da luz promovida pelas células. Quanto maior a densidade de células na amostra, maior será a absorção de luz e, conseqüentemente, menor será a passagem de luz. Porém, o uso da contagem indireta exige a garantia de que as células estejam vivas, pois as células mortas também contribuem para a absorção de luz. Para se ter essa garantia utilizou-se o corante azul de metileno, o qual cora somente as células mortas permitindo a diferenciação das células na hora da contagem.

Para o uso da contagem indireta é necessário o estabelecimento da curva de correlação de densidade óptica em função da densidade celular, conforme apresentado na Figura 14. Essa relação deve ser estabelecida para cada laboratório, pois podem ocorrer variações para cada leitora de densidade óptica.

Considerando a curva de crescimento de levedura (Figura 13) e a curva de correlação para densidade óptica em função da densidade celular (Figura 14), o tempo de crescimento do cultivo de células para a inoculação no ensaio foi estabelecido para  $24 \text{ h} \pm 4 \text{ h}$  (fase logarítmica) e a absorvância inicial no poço da placa de ensaio foi estabelecido em 0,045 ( $1,35 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) para a realização do ensaio YES.

Figura 14 – Curva de correlação entre densidade óptica obtida por meio da leitura de absorbância no espectrofotômetro (620nm) e densidade celular (células mL<sup>-1</sup>) obtida através da contagem direta de células com a câmara de Neubauer e o microscópio



#### 4.1.2. Variação da densidade celular inicial e do tempo de incubação do ensaio para o controle positivo E2

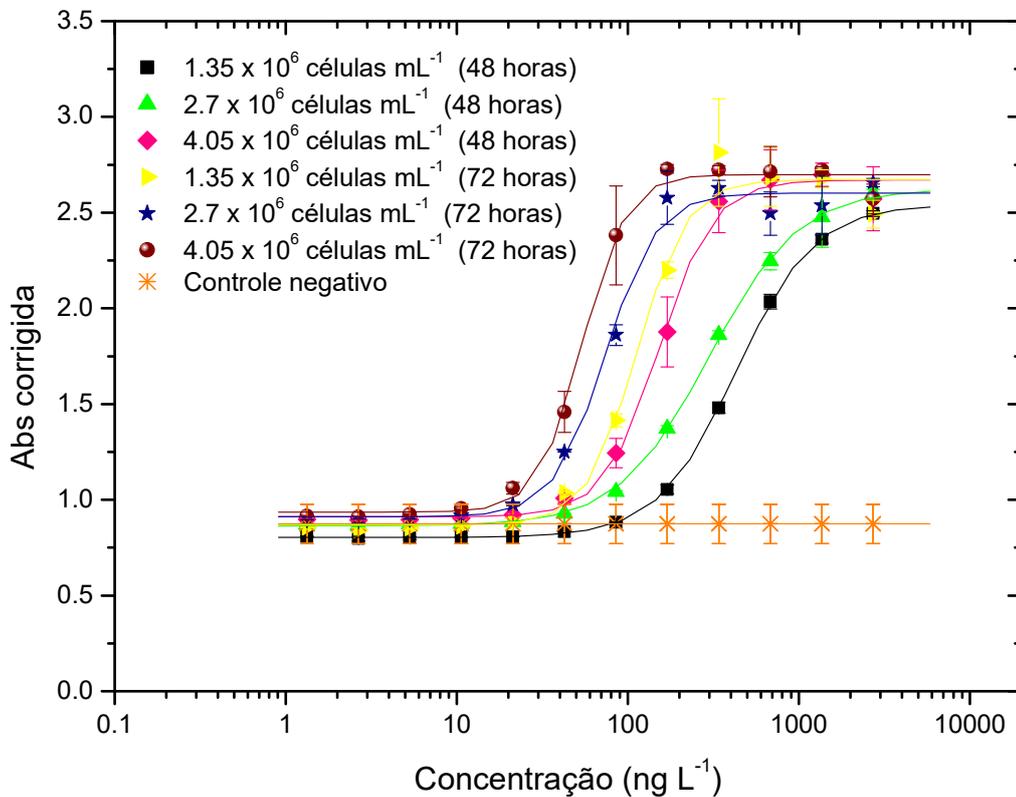
A densidade de células utilizadas no ensaio delimita o número de receptores de estrogênio disponíveis, pois cada célula contém um receptor produzido de forma constitutiva, o que garante que todas as células tenham o receptor de estrogênio e este não se perca em nenhum momento de reprodução e cultivo celular (PURVIS et al., 1991).

Neste trabalho, foram realizados testes com 3 diferentes densidades celulares iniciais:  $1,35 \times 10^6$ ,  $2,7 \times 10^6$  e  $4,05 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>, correspondendo à densidade padrão, duas vezes

e três vezes a densidade padrão adotada neste estudo, respectivamente. Os resultados foram avaliados após 48 e 72 horas de incubação do ensaio.

Tanto o aumento da densidade inicial de células quanto do tempo de incubação do ensaio, deslocaram as curvas dose-resposta resultantes para a esquerda (Figura 15), sugerindo uma maior sensibilidade do ensaio e apresentando menores valores de CE50, LD e LQ.

Figura 15 – Curvas dose-resposta do controle positivo E2 com diferentes densidades iniciais de células ( $1.35 \times 10^6$ ,  $2.7 \times 10^6$  e  $4.05 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) para 48 horas e 72 horas de incubação do ensaio



Considerando a sensibilidade do método, o LD obtido para as leituras de 72 h foi de  $23,4 \text{ ng L}^{-1}$ ,  $11,7 \text{ ng L}^{-1}$  e  $11,7 \text{ ng L}^{-1}$  para  $1,35 \times 10^6$ ,  $2,7 \times 10^6$  e  $4,05 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente, enquanto  $93,6 \text{ ng L}^{-1}$ ,  $46,8 \text{ ng L}^{-1}$  e  $23,4 \text{ ng L}^{-1}$  foram os valores de LD obtidos para as leituras de 48 h dos mesmos três ensaios (Tabela 7).

Tabela 7 – Limites de detecção para diferentes densidades celulares e tempos de incubação do ensaio

Densidade celular (células mL <sup>-1</sup> )	Limite de detecção (ng L <sup>-1</sup> )	
	Tempo de incubação do ensaio	
	72 horas	48 horas
1,35 x 10 <sup>6</sup>	23,4	93,6
2,7 x 10 <sup>6</sup>	11,7	46,8
4,05 x 10 <sup>6</sup>	11,7	23,4

No entanto, como o ensaio é geralmente realizado com amostras concentradas, após a multiplicação pelo fator de diluição da amostra no ensaio, o LD deve ser dividido pelo fator de concentração da amostra. Sendo assim, essa redução do LD pode não influenciar tanto, dependendo da concentração empregada na EFS. Por exemplo, considerando o fator máximo de concentração aplicado neste estudo (500 x), o LD das leituras de 72 h se tornaria 0.9 ng L<sup>-1</sup>, 0,5 ng L<sup>-1</sup> e 0,5 ng L<sup>-1</sup> para 1,35 x 10<sup>6</sup>, 2,7 x 10<sup>6</sup> e 4,05 x 10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Esses valores podem não ser uma variação relevante mediante a concentração de atividade estrogênica que geralmente é encontrada em amostras ambientais.

É importante destacar também que amostras, controles negativos e positivos devem ser semeados sempre com a mesma densidade celular, para que a interpolação das curvas e, assim, a quantificação da atividade estrogênica, possam ser realizadas com segurança para as matrizes ambientais. Porém, valores de EQ-E2 de diferentes ensaios com diferentes densidades celulares iniciais podem ser comparados, desde que cada ensaio tenha seu próprio controle positivo e negativo.

Para garantir que os resultados da CE50 sejam comparáveis, é necessário que a densidade inicial de células seja uniforme para todos os ensaios laboratoriais, pois a variação dessa densidade influencia nesses resultados. Porém, se os ensaios não foram realizados com a mesma densidade celular, os valores de potência relativa ainda são dados comparáveis, pois o resultado é obtido a partir da razão entre a CE50 de E2 e a CE50 da amostra, ambos realizados na mesma bateria de ensaio e com a mesma densidade celular.

Routledge e Sumpter (1996), precursores do ensaio YES, reportaram a densidade inicial de células de levedura na microplaca como 8 x 10<sup>5</sup> células mL<sup>-1</sup>, um valor menor em

comparação ao presente estudo. Beresford et al., (2000) realizaram ensaios com  $8 \times 10^5$ ,  $4 \times 10^6$  e  $1,6 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ , que foram: a mesma densidade de Routledge e Sumpter (1996), 5 vezes maior e 5 vezes menor que a densidade original, respectivamente. Seu estudo também relatou uma influência da densidade celular na sensibilidade do ensaio. A densidade menor levou a um deslocamento para a direita na curva dose-resposta e, portanto, a diminuição da sensibilidade do ensaio. No entanto, eles relataram não observar diferenças na PR do bisfenol-A, que foi aproximadamente 10.000 vezes menos potente do que o  $17\beta$ -estradiol em ambos os ensaios com as diferentes densidades celulares.

Atualmente, os autores raramente mencionam a densidade inicial de células utilizada, mas vale ressaltar que, sem o conhecimento desta condição dos ensaios, os dados da CE50 de diferentes laboratórios não são comparáveis.

Para resultados precisos, a densidade celular deve ser sempre consistente, porém a densidade ideal pode variar de acordo com o grau de estrogenicidade da amostra ambiental a ser analisada. No entanto, é recomendado que seja estabelecida uma densidade intralaboratorial para os ensaios a serem realizados. Para o processo de concentração utilizado neste estudo, o uso de  $1,35 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  foi satisfatório e adotado para todas as baterias de ensaio.

#### 4.1.3. Avaliação do espectro de absorção do CPR e seleção do comprimento de onda para a leitura do ensaio

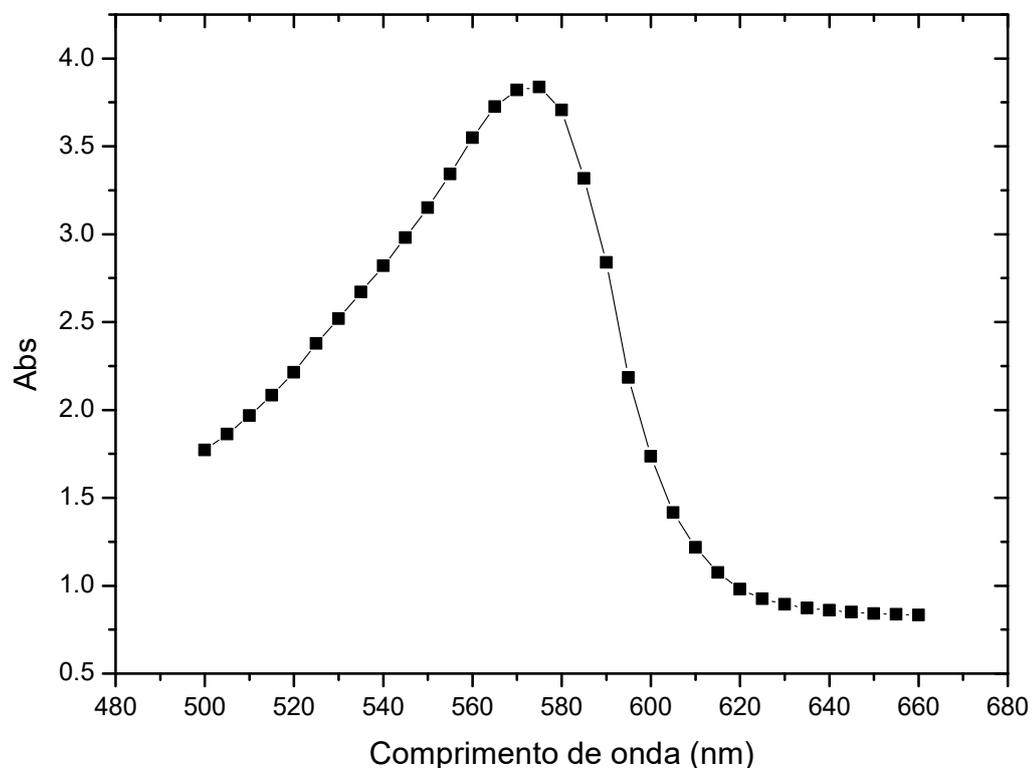
No presente estudo, o substrato cromogênico utilizado foi o CPRG na concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  no meio de análise, mesma concentração usada por Routledge e Sumpter (1996). A variação desta concentração pode levar a resultados insatisfatórios, pois apesar da potência estrogênica de uma amostra garantindo, portanto, a indução à produção da enzima  $\beta$ -galactosidase, a falta de CPRG no meio de análise pode influenciar a resposta mensurada do ensaio. Em suma, pode não haver CPRG suficiente para ser degradado em CPR pela enzima produzida e, assim, produzir uma resposta estrogênica subestimada.

O melhor comprimento de onda para quantificar o produto de degradação do CPRG foi investigado e o comprimento de 575 nm apresentou a maior absorção (Figura 16), este foi

adotado para medir a resposta do ensaio YES neste estudo, embora Routledge e Sumpter (1996) tenham estabelecido a resposta lida a 540 nm no protocolo original. A adoção de um comprimento de onda específico pode ocorrer devido a particularidades, como um equipamento sem filtro de 575 nm, pois a resposta medida em 540 nm, por exemplo, foi 30% menor do que a medida em 575 nm (Figura 16).

No entanto, um determinado comprimento de onda é satisfatório para ser utilizado desde que a curva sigmoïdal seja formada para o controle positivo. Uma vez estabelecido um comprimento de onda, este deve sempre ser usado e uma amostra avaliada em um determinado comprimento de onda não pode ser comparada a um controle positivo avaliado em outro comprimento de onda. Mesmo assim, a PR e o EQ-E2 estabelecidos ainda são valores comparáveis, independente do comprimento de onda utilizado.

Figura 16 – Absorbância do substrato CPR medida na faixa de 500 a 660 nm



#### 4.1.4. Carta controle, limites de detecção e quantificação e teste de recuperação

Como o ensaio YES é um bioensaio, este deve cumprir alguns requisitos inerentes à ecotoxicologia. Em geral, toda bateria de ensaio exige um controle positivo e um negativo. O composto E2 foi usado como substância de referência positiva e o etanol foi usado como controle negativo. Laboratórios podem divergir sobre essa escolha, mas o controle positivo deve ser sempre um composto altamente estrogênico, adquirível e consistentemente puro, com informações sobre estabilidade, solubilidade, estrogenicidade e método analítico previamente estabelecidos (ENVIRONMENT CANADA, 1990), enquanto um controle negativo deve ser um solvente não tóxico para células de levedura com elevado grau de pureza (grau HPLC) (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2014).

Além disso, alguns pontos como carta controle, limites de detecção e quantificação e testes de recuperação são importantes serem estabelecidos para o controle e confiabilidade dos resultados do ensaio.

A elaboração da carta controle para o ensaio YES é uma importante ferramenta de acompanhamento. Embora seu uso em ensaios de ecotoxicidade esteja bem estabelecido, para o ensaio YES não foi encontrado nenhum estudo que apresentasse tais dados, o que dificulta a comparação de resultados interlaboratoriais.

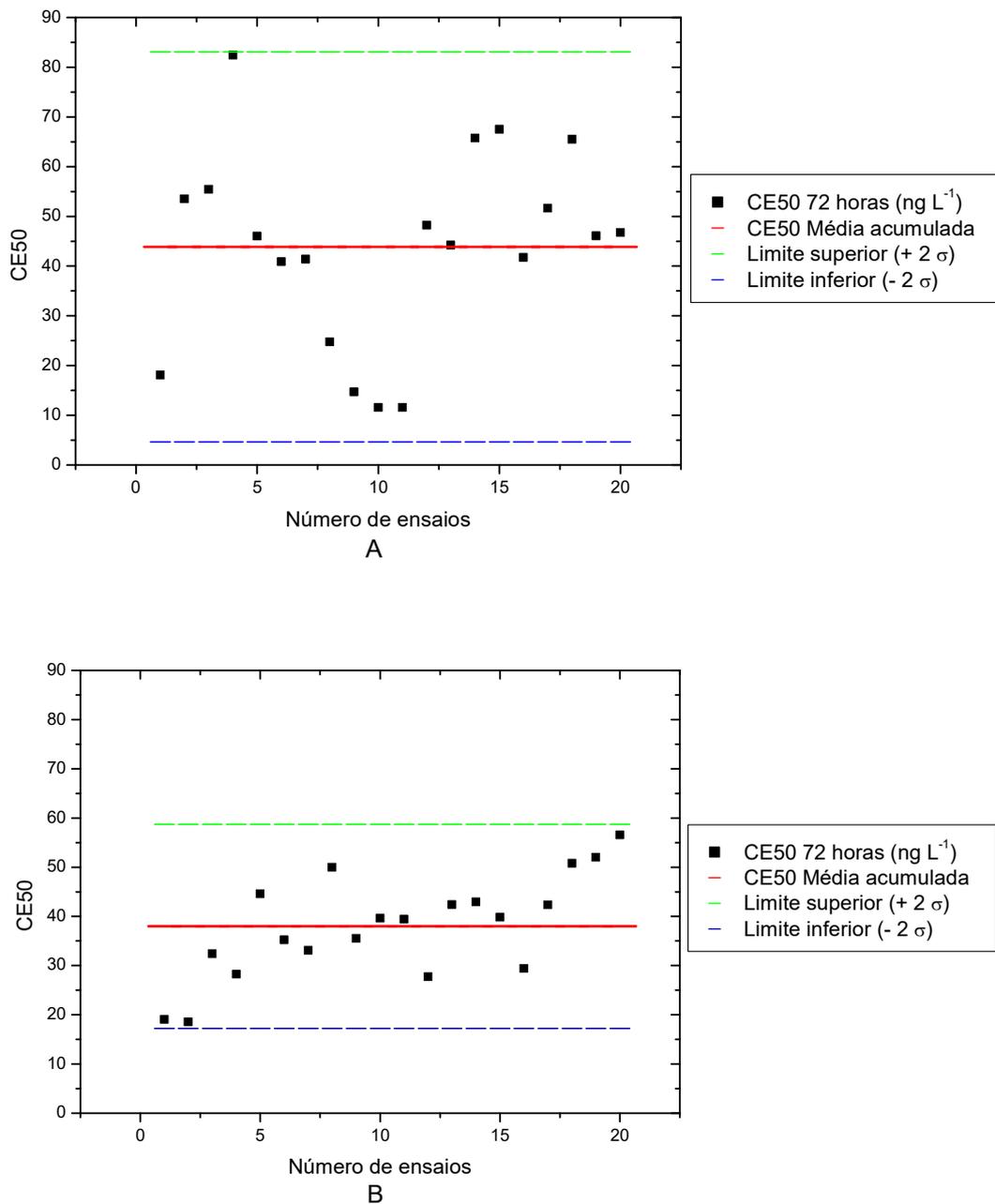
Para a elaboração da carta controle, a CE50 do 17 $\beta$ -estradiol (controle positivo) é levada em consideração. A CE50 pode variar dependendo das condições do ensaio, sendo diretamente influenciada por fatores físicos e químicos, densidade celular, tempo de incubação e experiência do operador (HETTWER et al., 2018).

Vale à pena mencionar que um organismo é usado no ensaio, portanto, mesmo que um protocolo criterioso seja seguido, um crescimento variável das células é esperado. Portanto, uma variação natural da CE50 também é esperada, mas a padronização do ensaio e o treinamento do operador mitigaram a alteração dos resultados neste estudo.

Durante os testes com diferentes densidades celulares (item 4.1.2.), a CE50 variou, assim como no início da implementação do ensaio, quando foram utilizadas densidades celulares menos rigorosas. Portanto, as cartas controles resultantes do começo da implementação do ensaio YES mostraram desvios-padrão mais amplos (Figura 17 A). Apesar disso, os valores de PR para compostos individuais e o EQ-E2 para matrizes ambientais foram

plausíveis de comparação, independentemente da variação da CE50 (como será apresentado posteriormente). A implementação do ensaio com um protocolo mais completo e otimizado reduziu os desvios no gráfico de controle, garantindo uma distribuição mais uniforme dos valores da CE50 (Figura 17 B).

Figura 17 – Cartas controles do ensaio YES para o controle positivo E2: (A) sem padronização do protocolo utilizado e (B) com um protocolo padronizado e otimizado obtido na fase 1 desse estudo, garantindo uma distribuição mais uniforme dos valores da CE50



A variação da CE50 também está relacionada à variação dos limites de detecção e quantificação do método. Não existe um protocolo amplamente estabelecido para o cálculo do LD e LQ de bioensaios. E, uma vez que o ensaio YES foi inicialmente usado para substâncias individuais, o principal interesse era avaliar se a substância era estrogênica ou calcular sua potência relativa, portanto, estabelecer LD e LQ não era uma prioridade. Desse modo, a sensibilidade do método não era de grande importância, uma vez que as substâncias testadas poderiam ser preparadas em uma concentração específica garantindo o seu enquadramento na curva dose-resposta do controle positivo. No entanto, a necessidade de determinar esses parâmetros surgiu quando o ensaio passou a ser utilizado para quantificar a estrogenicidade de amostras ambientais, pois os DE são encontrados em baixas concentrações no ambiente (BILA e DEZOTTI, 2007) e mesmo as amostras mais estrogênicas possuem concentrações na ordem de  $\text{ng L}^{-1}$  (KUNZ et al., 2015). No entanto, nem todos os autores relatam o LD do ensaio usado e o seu método de cálculo.

Leusch et al. (2017) avaliaram a sensibilidade de vários bioensaios *in vitro* incluindo o YES, o LD foi definido como a CE10 multiplicada pelo fator de diluição e dividido pelo fator de concentração da EFS, resultando em  $1,2 \text{ ng L}^{-1}$ . Brix et al. (2010) utilizaram o ensaio YES para a análise de amostras sintéticas e ambientais e o método para o cálculo do LD foi descrito como 3 vezes o desvio padrão do controle de solvente para cada placa, variando de 84 a  $735 \text{ ng L}^{-1}$  com um valor médio de  $297 \text{ ng L}^{-1}$ . Lorenzen et al. (2004) determinaram o LD como a CE20 de cada controle positivo realizado, obtendo o valor  $50 \pm 10 \text{ ng L}^{-1}$ , e Wenzel et al. (2003) definiram o LD como a atividade relativa acima do valor de 10% do controle negativo, resultando em um valor de  $12 \text{ ng L}^{-1}$ .

No presente estudo, o LD variou de acordo com o período de realização do ensaio e os limites e cartas controle foram restabelecidos sempre para os últimos 20 controles positivos analisados. O menor LD obtido foi de  $7 \pm 3 \text{ ng L}^{-1}$  ( $n=20$ ) e atingiu o valor de  $0,28 \pm 0,12 \text{ ng L}^{-1}$  após a divisão pelo maior fator de concentração (500 x) aplicado à amostra ambiental e a multiplicação pelo fator de diluição da amostra no ensaio (20 x). Da mesma forma, o menor valor de LQ calculado foi  $21 \pm 10 \text{ ng L}^{-1}$  sem considerar o fator de concentração da amostra pela EFS (500 x) e de diluição da amostra no ensaio (20 x), atingindo o valor de  $0,84 \pm 0,4 \text{ ng L}^{-1}$  considerando esses fatores.

A documento da União Europeia (UE) 2018/840 propõe o limite mínimo de detecção estabelecido em  $0,4 \text{ ng L}^{-1}$  para o monitoramento do  $17\beta$ -estradiol (E2) em águas superficiais,

considerando que o bioensaio YES monitora o somatório da atividade estrogênica e não somente um composto individual, fica evidente a aplicabilidade do ensaio para a análise dos efeitos da atividade estrogênica.

Comparativamente, os ensaios com linhagens de células de mamíferos têm LD menor, variando de 0,06 a 0,34 ng L<sup>-1</sup> (LEUSCH et al., 2017), para o ensaio YES atingir esse nível de sensibilidade a concentração de amostra não pode ser dispensada. No entanto, o ensaio YES ainda é apropriado para amostras ambientais e, devido a sua simplicidade, é acessível para países em desenvolvimento.

Além do LD e LQ, conhecer a recuperação da metodologia empregada também é importante, pois o tratamento e a preparação de amostras ambientais (por exemplo, filtração + EFS) pode levar a perdas dos analitos de interesse durante o processo.

Neste estudo, as amostras foram concentradas por EFS utilizando o cartucho Strata-X (sorvente polimérico à base de estireno-divinilbenzeno com superfície modificada) e os valores de recuperação obtidos em todo o processo de extração e concentração das amostras de água ultrapura enriquecida com E2 foram de 107% e 101% para a menor dopagem (2 ng L<sup>-1</sup>) e 96% e 104% para a maior dopagem (12 ng L<sup>-1</sup>).

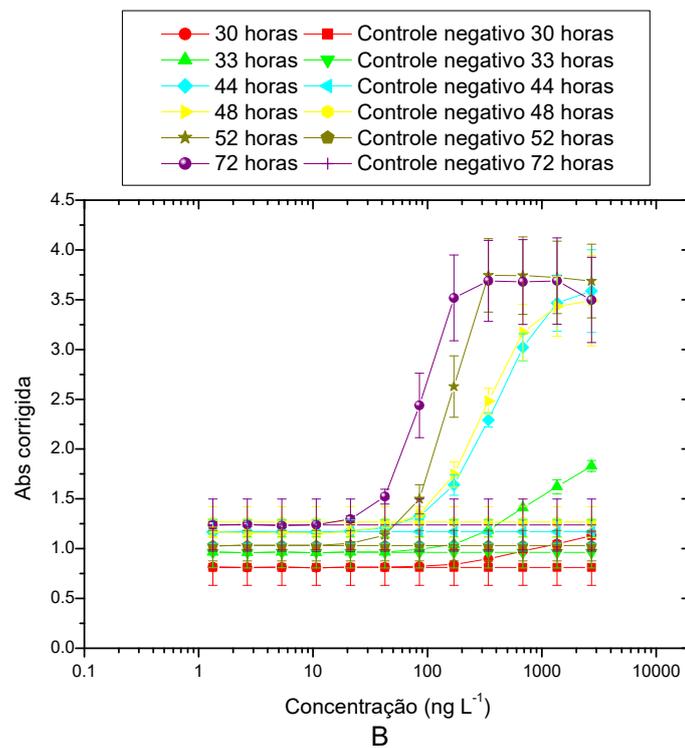
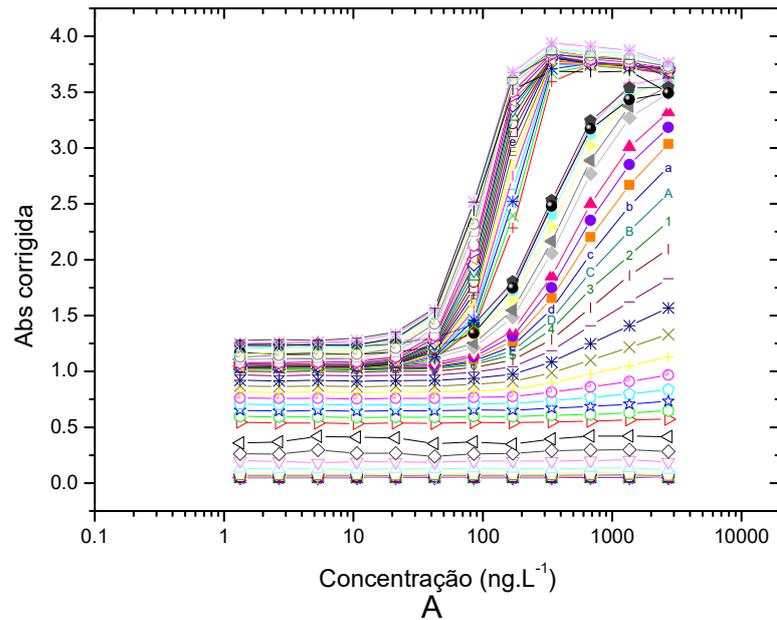
A extração também foi aplicada às membranas de fibra de vidro de 0,7 µm e membranas de nylon de 0,45 µm, ambas adquiridas pela Millipore®, a fim de avaliar possíveis analitos retidos. Os extratos das membranas não apresentaram atividade estrogênica, confirmando sua confiabilidade para a metodologia empregada. Os resultados também ratificam que os materiais que compõem as membranas utilizadas não são estrogênicos e não retêm analitos dissolvidos.

#### 4.1.5. Variação da duração do tempo de incubação do ensaio de amostras ambientais

No protocolo descrito por Routledge e Sumpter (1996), o ensaio é realizado com incubação por 72 horas. Aspirando a uma redução desse tempo de incubação do ensaio, mas sem empregar a lise celular conforme realizado por alguns autores (FRISCHE et al., 2009; GAIDO et al., 1997; LORENZEN et al., 2004; METCALFE et al., 2013; VIGANÒ et al., 2008) e pela ISO 19040-1, realizou-se a leitura das absorbâncias do controle positivo E2 e do controle

negativo (solvente) de hora em hora e avaliou-se o comportamento e a formação da curva dose-resposta do controle positivo durante todo o tempo de incubação padrão do ensaio (Figura 18).

Figura 18 – Formação e comportamento das curvas de dose-resposta do controle positivo durante o período de incubação – (A) Todas as 72 horas e (B) Principais tempos



Observou-se que a diferenciação da absorbância entre os controles negativos e positivos em um ensaio com densidade inicial de  $1,35 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  iniciou após 30 h de incubação. Após 44 h, o valor máximo de absorbância foi alcançado e a curva sigmoideal foi formada. No entanto, com 48 horas a CE50 ainda era muito alta ( $300 \text{ ng L}^{-1}$ ), e em 52 horas a CE50 havia reduzido quase que à metade ( $148 \text{ ng L}^{-1}$ ). Após 72 horas de incubação, a CE50 caiu cerca de 40% em comparação ao resultado de 52 horas e atingiu  $84 \text{ ng L}^{-1}$ .

Os dados obtidos sugerem que um tempo de incubação de 48 h é possível para o ensaio YES, pois uma curva sigmoideal é formada e a CE50 é calculável para o controle positivo, permitindo assim a quantificação da atividade estrogênica pela interpolação (Eq. 2) ou pela potência relativa (Eq. 4). Porém, após 48 h, o limite de detecção ainda é 4 vezes maior do que no ensaio incubado por 72 h, atingindo  $94 \text{ ng L}^{-1}$  e  $23 \text{ ng L}^{-1}$ , respectivamente. Ainda assim, conforme explicado na seção 4.1.4, essa variação do LD e do LQ pode não ser um fator limitante para o cálculo da atividade estrogênica, uma vez que as amostras ambientais costumam estar concentradas.

Para elucidar esta questão, o EQ-E2 de seis amostras de água superficial foi calculado com dados de absorbância de 48 h e 72 h de tempo de incubação. Os resultados de EQ-E2 foram semelhantes nesses casos e o resultado abaixo do LD após as leituras de 48 horas permaneceram abaixo do LD quando incubados por 72 horas, duas amostras (AS2 e AS3) apresentaram citotoxicidade para ambos os horários de observação da resposta do ensaio. No entanto a citotoxicidade não impediu o cálculo da atividade estrogênica dessas amostras (Figura 19 e 20).

Assim, o tempo de incubação pode variar dependendo da potência estrogênica e do fator de concentração da amostra ambiental a ser analisada. Amostras com a presença de maior concentração de xenoestrogênios podem ter a duração do ensaio convenientemente reduzida, uma vez que níveis extremamente baixos de LD e LQ não são exigidos. Por outro lado, matrizes ambientais com menor potência estrogênica, podem requerer incubação completa de 72 h para garantir o LD e LQ suficientemente sensíveis e compatíveis com a concentração da atividade estrogênica a ser analisada.

Figura 19 – Valores de EQ-E2 de amostras de água superficial determinados com dados de absorvância de períodos de incubação de 48 e 72 h

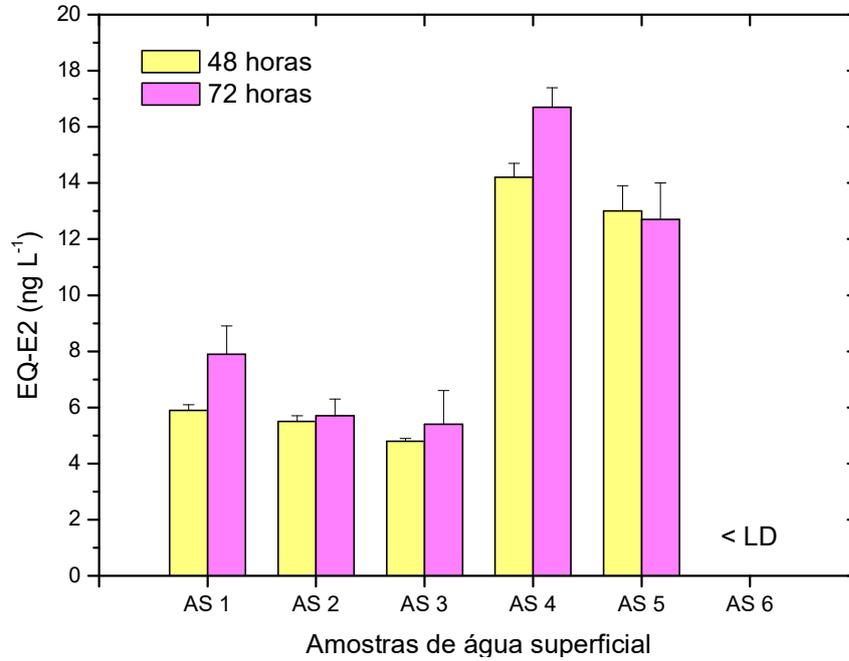
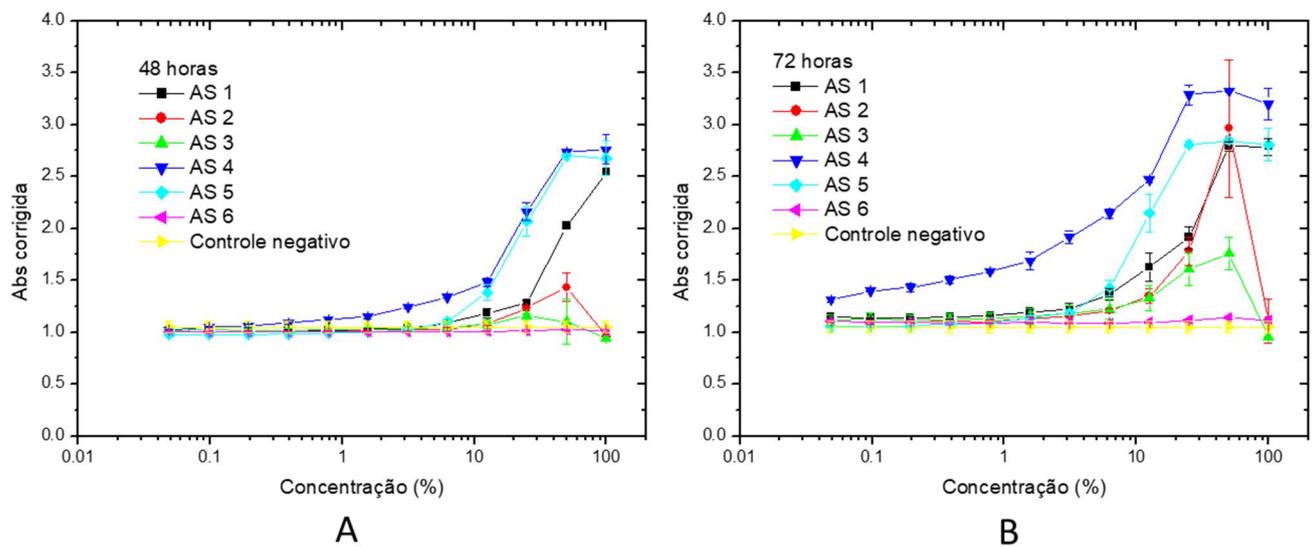


Figura 20 – Curvas dose-resposta de amostras de água superficial com (A) 48 horas e (B) 72 horas de duração de incubação do ensaio

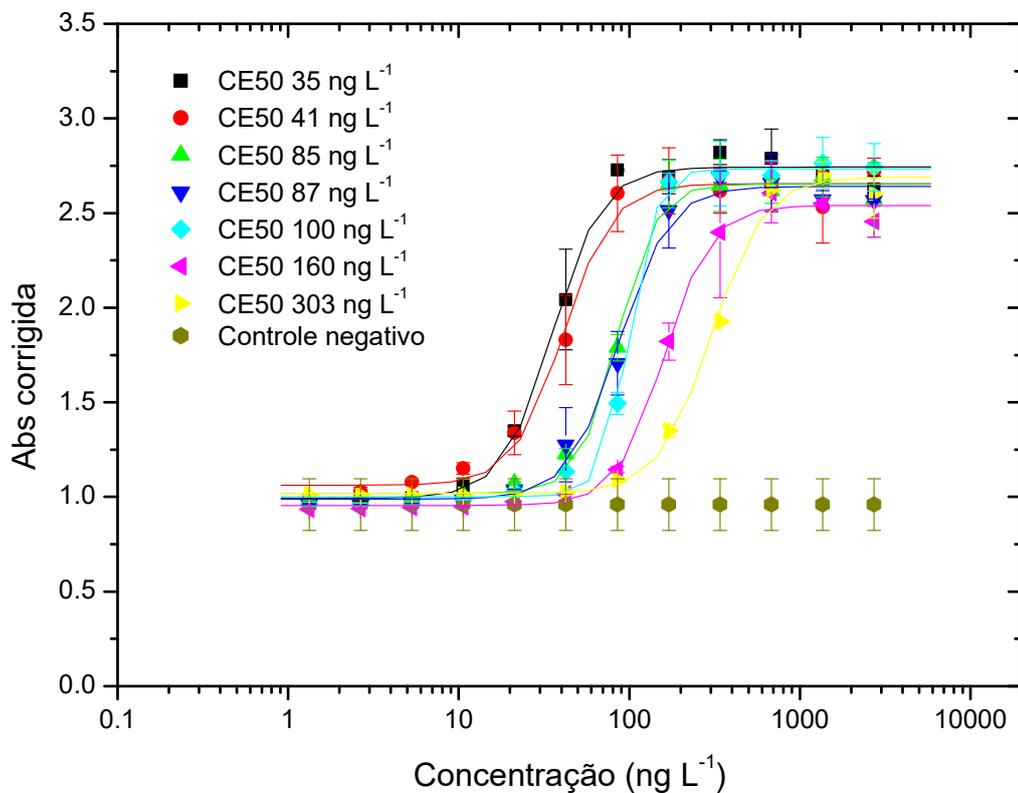


#### 4.1.6. Curvas dose-resposta do controle positivo E2 em solução aquosa

Como forma de reduzir o tempo e as etapas de preparo das amostras, avaliou-se a realização do ensaio com o controle positivo E2 em solução aquosa.

Manteve-se a mesma concentração de  $54,48 \mu\text{g L}^{-1}$  para a solução aquosa de E2 e a análise dos resultados mostrou um maior desvio dos resultados da CE50 que o desvio apresentado para as curvas realizadas com a solução de E2 em etanol. A CE50 variou de 35 a  $303 \text{ ng L}^{-1}$  ( $n=7$ ) e o limite de detecção e quantificação foi de  $10 \pm 3 \text{ ng L}^{-1}$  e  $30 \pm 10 \text{ ng L}^{-1}$ , respectivamente (Figura 21) (Chaves et al., 2020). Mesmo mantendo um protocolo rígido e criterioso não foi possível reduzir essa variação da CE50.

Figura 21 – Curvas dose resposta do controle positivo E2 ( $54,48 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em solução aquosa

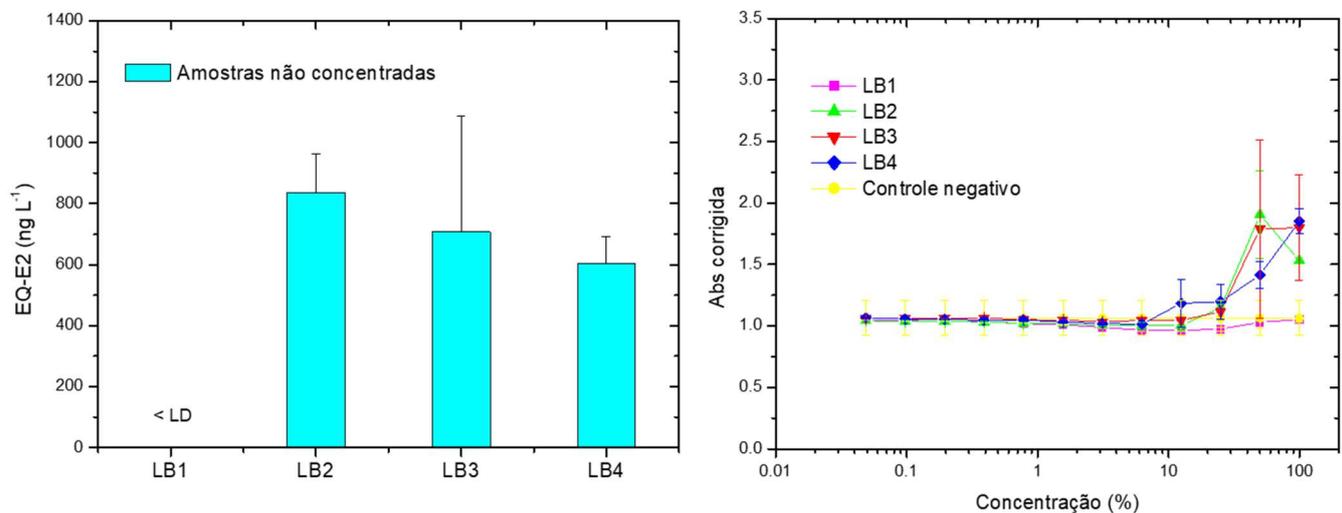


Após o conhecimento do comportamento da curva dose-resposta do E2 em solução aquosa, analisou-se amostras ambientais sem a realização das etapas de filtração e EFS. As amostras analisadas foram de lixiviado bruto, a escolha se deu devido a suposição de se encontrar elevadas concentrações de xenoestrogênios nessa matriz, considerando que mesmo sem a etapa de concentração, a atividade estrogênica da amostra estaria acima do limite de detecção e de quantificação do método.

Os resultados de EQ-E2 encontrados para as amostras sem filtração e EFS variaram de 604 a 837 ng L<sup>-1</sup> e abaixo do limite de detecção para uma das amostras analisadas (Figura 22). Um ponto relevante a ser destacado foi que durante a realização dos experimentos, encontrou-se maior dificuldade na pipetagem e diluição das soluções aquosas na placa de 96 poços quando comparadas às soluções em solvente (etanol), e, provavelmente, a maior viscosidade das amostras ambientais induziu a maiores erros, aumentando os desvios das duplicatas, como pode ser notado na amostra LB 3, por exemplo (Figura 22).

Mesmo com as dificuldades de pipetagem das amostras em solução aquosa, o ensaio YES permitiu a quantificação da atividade estrogênica, ainda que os desvios apresentados tenham sido grandes para as amostras ambientais analisadas.

Figura 22 – Valores totais de EQ-E2 e curvas dose-resposta de amostras não concentradas de lixiviado bruto de aterro sanitário



#### 4.1.7. Consolidação dos resultados da fase 1

A elaboração da curva de crescimento da levedura, os testes com diferentes densidades celulares iniciais, a seleção do comprimento de onda para a leitura do ensaio, a elaboração da carta controle para o composto E2, o estabelecimento dos limites de detecção e quantificação do ensaio, a análise da variação do tempo de incubação do ensaio e a avaliação da curva dose-resposta do controle positivo E2 em solução aquosa permitiram a otimização do protocolo do ensaio YES (APÊNDICE 2).

Nesse protocolo, a densidade celular inicial estipulada foi de  $1,35 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>, a fase de crescimento da *Saccharomyces cerevisie* usada no inóculo foi a fase log, o que corresponde a  $24 \pm 4$  horas de crescimento. O comprimento de onda estipulado para a leitura da resposta do ensaio foi de 575 nm para a cor e 620 nm para a turbidez (crescimento celular). Para o tempo de incubação do ensaio, definiu-se 72 horas para amostras com menor potencial estrogênico e 48 horas para amostras com maior potencial estrogênico. Para o cálculo do LD foi definido o valor de 1,1 vezes a concentração imediatamente abaixo da menor diluição detectada de E2 e o LQ foi definido como 3 vezes o LD.

Além da otimização do protocolo do ensaio YES obtido nesta fase, também se obteve os dados de recuperação do método de extração empregado, este mostrou-se eficiente para a análise da atividade estrogênica pelo ensaio YES. Essa metodologia de EFS também pode vir a ser utilizada para outros bioensaios e até mesmo para métodos analíticos que necessitem da concentração da amostra.

## 4.2. Fase 2: Avaliação da atividade estrogênica e antiestrogênica de monossoluções de compostos orgânicos, misturas e matrizes ambientais

### 4.2.1. Atividade estrogênica de monossoluções de compostos orgânicos

Substâncias químicas são avaliadas mais facilmente devido à possibilidade de preparar uma solução estoque em uma concentração específica que acione o receptor de estrogênio. Além do estabelecimento de uma concentração específica que produza a quantidade necessária da enzima  $\beta$ -galactosidase para degradar o substrato cromogênico CPRG em CPR, também é viável o ajuste para que esta concentração não seja citotóxica.

A resposta estrogênica para um único composto foi expressa como potência relativa (Eq. 4). Cada composto apresenta um LD relacionado à sua potência estrogênica, isto é, relacionado ao seu mecanismo de ação e afinidade com o receptor de estrogênio. A Tabela 8 e a Figura 23 apresentam os resultados das monossoluções analisadas nesse estudo.

Tabela 8 –Valores de PR, citotoxicidade e LD das monossoluções de compostos orgânicos analisadas pelo ensaio YES (as concentrações nominais das soluções estoques e as testadas no ensaio foram apresentadas na Tabela 5)

<b>Composto</b>	<b>PR</b>	<b>Citotoxicidade</b>	<b>LD (ng L<sup>-1</sup>)</b>
17 $\beta$ -estradiol (E2)	1	-	12
17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2)	1.25	-	6
Estrona (E1)	0.39	-	16
Estriol (E3)	5.28E-03	-	269
Bisfenol-A (BPA)	7.31E-04	-	13293
Etilparabeno (EP)	4.54E-03	22%	752
Butilparabeno (BP)	0.14	87%	54
Metilparabeno (MP)	5.92E-04	2%	12031
Propilparabeno (PP)	1.16E-02	21%	430

*Continua*

*Continuação*

Tabela 8 –Valores de PR, citotoxicidade e LD das monossoluções de compostos orgânicos analisadas pelo ensaio YES (as concentrações nominais das soluções estoques e as testadas no ensaio foram apresentadas na Tabela 5)

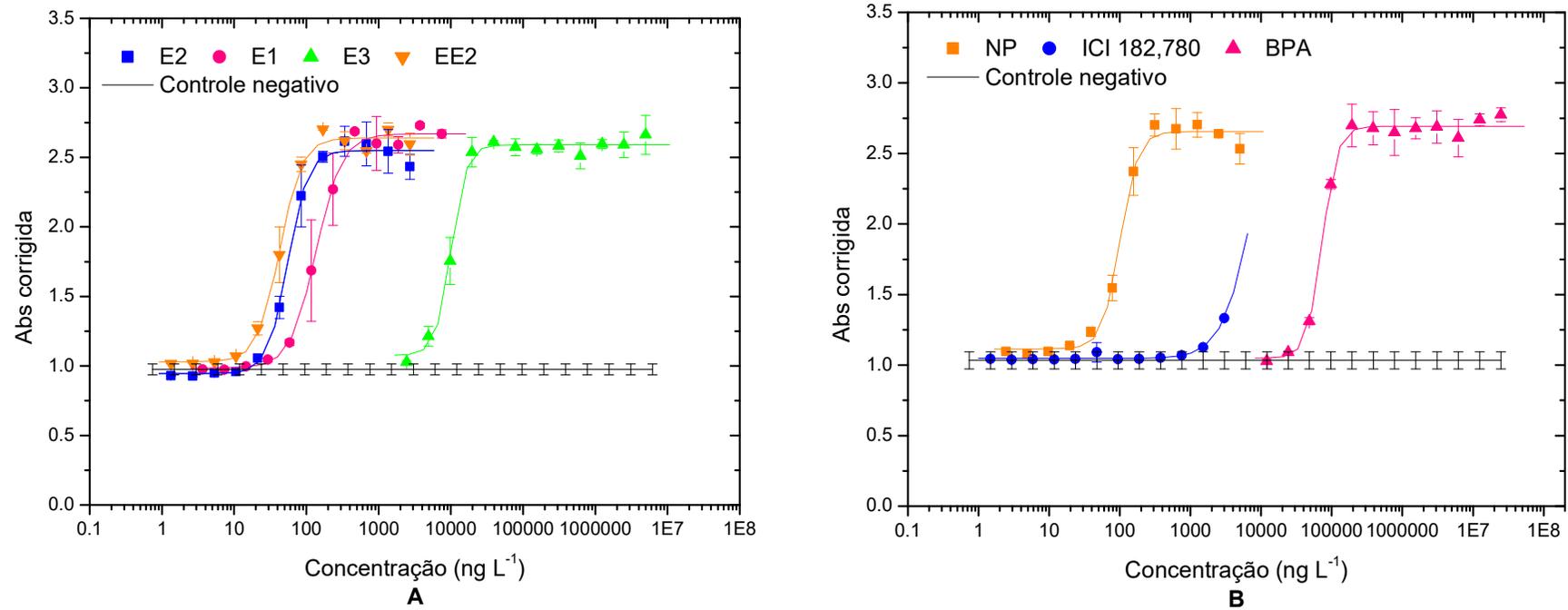
<b>Composto</b>	<b>PR</b>	<b>Citotoxicidade</b>	<b>LD (ng L<sup>-1</sup>)</b>
Fulvestrant (ICI 182,780)	2.14E-02	-	825
Atrazina	-	-	-
Simazina	-	-	-
Triclosan	-	-	-
Cafeína	-	-	-
Nonilfenol	0.53	-	21

(PR) Potência relativa.

(LD) Limite de detecção do composto no ensaio YES.

A citotoxicidade foi apresentada para a maior concentração analisada da amostra.

Figura 23 – Curvas de dose-resposta das monossoluções de compostos orgânicos avaliadas pelo ensaio YES: (A) Estrogênios, (B) Nonilfenol, Bisfenol-A e Fulvestrant, (C) Parabenos e (D) Atrazina, Simazina, Triclosan e Cafeína

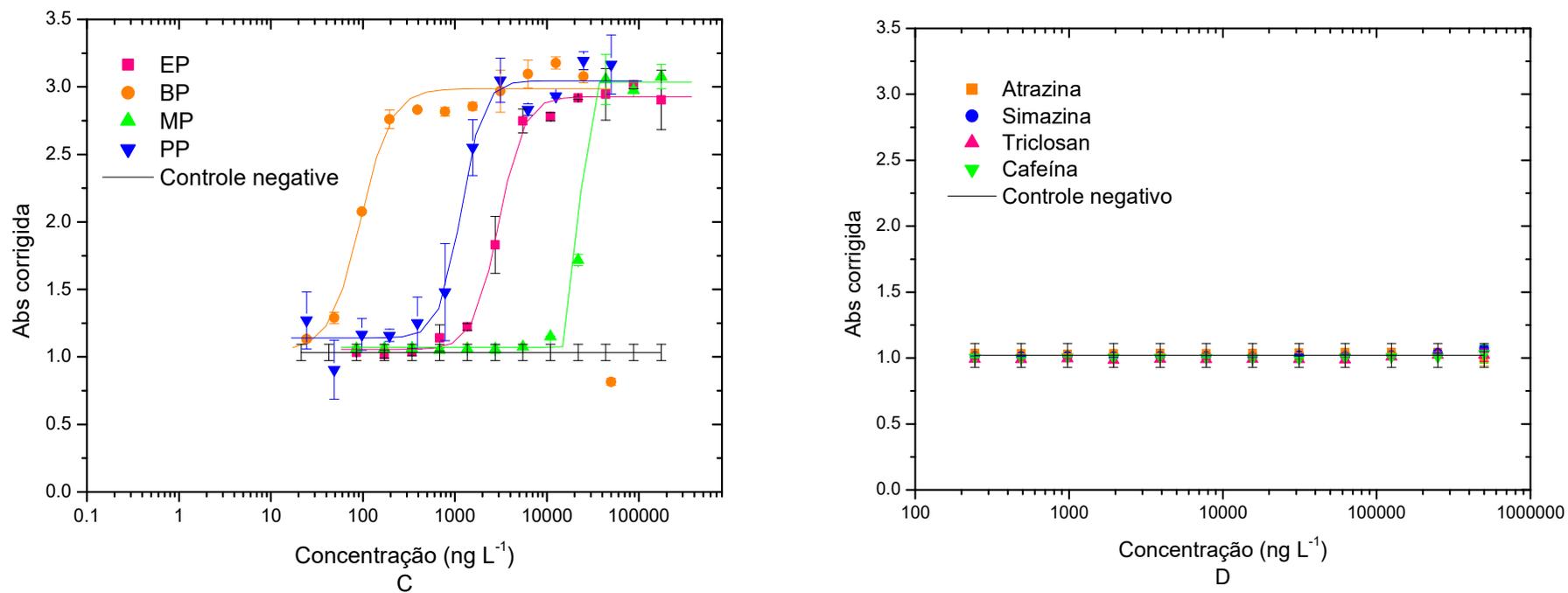


Legenda: E2 – 17 $\beta$ -estradiol, E1 – estrona, E3 – estriol, EE2 - 17 $\alpha$ -etinilestradiol, EP – etilparabeno, BP – butilparabeno, MP – metilparabeno, PP – propilparabeno, NP – nonilfenol, ICI 182,780 – fulvestrant, BPA – bisfenol-

*Continua*

Continuação

Figura 23 – Curvas de dose-resposta das monossoluções de compostos orgânicos avaliadas pelo ensaio YES: (A) Estrogênios, (B) Nonilfenol, Bisfenol-A e Fulvestrant, (C) Parabenos e (D) Atrazina, Simazina, Triclosan e Cafeína



Legenda: E2 – 17 $\beta$ -estradiol, E1 – estrona, E3 – estriol, EE2 - 17 $\alpha$ -etinilestradiol, EP – etilparabeno, BP – butilparabeno, MP – metilparabeno, PP – propilparabeno, NP – nonilfenol, ICI 182,780 – fulvestrant, BPA – bisfenol-A.

Dentre os compostos analisados, o EE2 apresentou a maior potência estrogênica, sendo 1,25 vezes mais potente que o controle positivo E2. A potência relativa pode variar de acordo com o ensaio realizado, pois ensaios *in vitro* nem sempre preveem os efeitos que podem ser observados nos ensaios *in vivo*, pois estes permitem a análise de efeitos provenientes de múltiplos mecanismos, como biodisponibilidade, metabolismo e *crosstalk* entre via genômica e não genômica (FOLMAR et al., 2002, 2000; HUGGETT et al., 2003; ZACHAREWSKI et al., 1995).

O BPA foi o menos estrogênico com um valor de PR de  $7,31 \times 10^{-4}$  (Tabela 8 e Figura 23). Apenas os parabenos foram citotóxicos para as células de levedura na faixa de concentração utilizada no ensaio. Etilparabeno, metilparabeno e propilparabeno apresentaram citotoxicidade apenas em suas concentrações de teste mais altas  $1,75 \times 10^8$ ,  $1,75 \times 10^8$  e  $5,00 \times 10^7$  ng L<sup>-1</sup>, respectivamente. O butilparabeno foi citotóxico em uma faixa mais ampla de concentração, de  $1,25 \times 10^7$  a  $5,00 \times 10^7$  ng L<sup>-1</sup>. A faixa de concentração relatada para esses compostos em cinco estações de tratamento de esgoto indianas foi de 131 à 920 ng L<sup>-1</sup> no afluente, 16 a 67 ng L<sup>-1</sup> no efluente e 104 a 1090 ng g<sup>-1</sup> de peso seco em amostras de lodo (KARTHIKRAJ *et al.*, 2017). E, notavelmente, o butilparabeno a 54 ng L<sup>-1</sup> mostrou uma resposta estrogênica neste estudo (Tabela 8), comprovando que as concentrações encontradas pelo estudo de Karthikrak et al. (2017) apresentariam atividade estrogênica pelo ensaio YES.

O mesmo composto pode apresentar mais de um mecanismo de ação, o BPA, por exemplo, atua via genômica e não genômica, no entanto a via genômica analisada pelo YES apresentou baixa potência relativa ( $7,31 \times 10^{-4}$ ), devido à baixa afinidade para o receptor nuclear relatado na literatura (KHETAN, 2014).

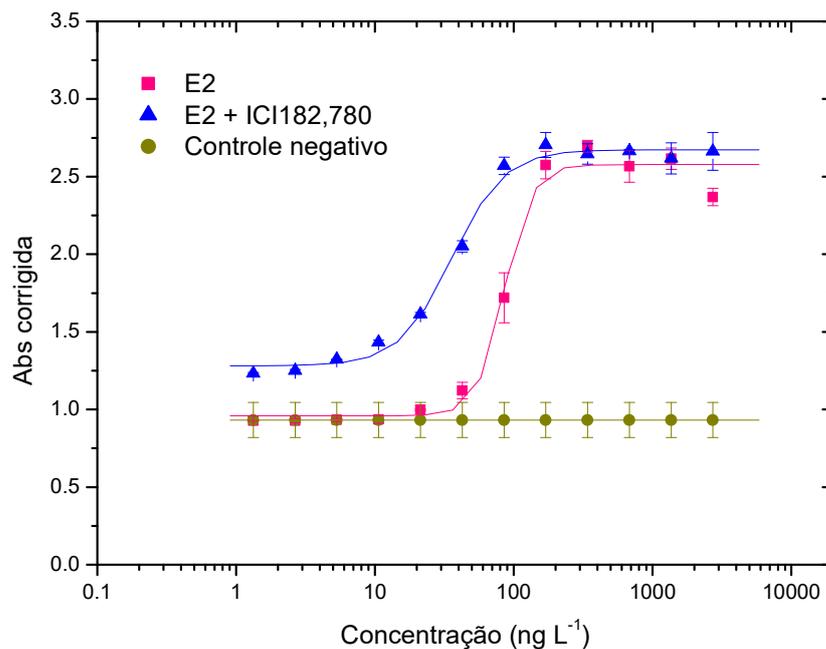
Os resultados elucidam que, entre os compostos avaliados, os estrogênios apresentam maior afinidade com o receptor nuclear, o que também explica porque esses compostos costumam ser responsáveis pela maior parte da atividade estrogênica que atinge as águas superficiais (JAROŠOVÁ et al., 2014; SUMPTER e JOHNSON, 2008).

As concentrações avaliadas de atrazina, simazina, triclosan e cafeína não induziram uma resposta estrogênica através do mecanismo de ação do ensaio YES, tampouco foram citotóxicas para a levedura.

Um evento interessante ocorreu com o composto antagonista puro (tipo II) fulvestrant (ICI 182.780), que compete com o E2 pela ligação ao receptor de estrogênio (PARRELLA et

al., 2014). Apesar desse composto ser um antagonista puro, ele não inibiu a resposta induzida pelo estradiol, mas produziu uma resposta puramente agonista no ensaio YES (Figura 24), reduzindo a CE50 da curva dose-resposta do E2 de 86 para 36 ng L<sup>-1</sup> quando foi adicionado junto ao E2. A razão consiste no fato de que sua ação após a ligação parece diferir de outros compostos antagonistas, como o 4-hidroxitamoxifeno (BERESFORD et al., 2000), e as leveduras não apresentam o complemento completo de proteínas repressoras adequadas necessárias para antagonismo neste caso (GAIDO et al., 1997). No entanto, a concentração de fulvestrant avaliada individualmente não foi suficiente para induzir a formação de uma curva dose-resposta completa (Figura 23).

Figura 24 – Curvas dose-resposta das monossoluções dos compostos ICI182,780 + E2 e E2 individualmente



#### 4.2.2. Atividade estrogênica de misturas

A maior parte do conhecimento e compreensão dos efeitos dos desreguladores endócrinos em seres vivos baseia-se nas respostas de compostos individuais. No entanto, as

amostras ambientais compreendem uma mistura complexa de vários compostos em diferentes concentrações e proporções. E, embora algumas substâncias estejam presentes no ambiente abaixo das máximas concentrações de efeitos não observados, elas podem contribuir para um efeito de mistura no ambiente e nos organismos.

Os bioensaios são recomendados para a avaliação dos efeitos cumulativos de compostos conhecidos e desconhecidos presentes em uma amostra, incluindo efeitos aditivos, sinérgicos e antagonísticos (HAMERS et al., 2013; HECKER and HOLLERT, 2011; SILVA et al., 2002; TOUSOVA et al., 2017). Portanto, podem colaborar para a definição de concentrações limites dos compostos que ainda não foram contemplados nas legislações.

Neste estudo, a concentração testada para o cálculo de EQ-E2 observado foram as concentrações mais baixas, dos compostos orgânicos, detectadas pelo mecanismo de ação do ensaio YES, ou seja, a menor concentração que causa uma resposta estrogênica neste ensaio. Nas misturas binárias de E2, EE2 e E1, as concentrações variaram de 5,32 a 10,64 ng L<sup>-1</sup> para E2 e EE2, e de 14,64 a 29,29 ng L<sup>-1</sup> para E1 no poço. Essas faixas encontram-se dentro das concentrações das curvas sigmoidais das misturas estudadas e apresentadas na Tabela 5, onde foi exibido tanto as concentrações das soluções estoque como das faixas testadas no ensaio YES.

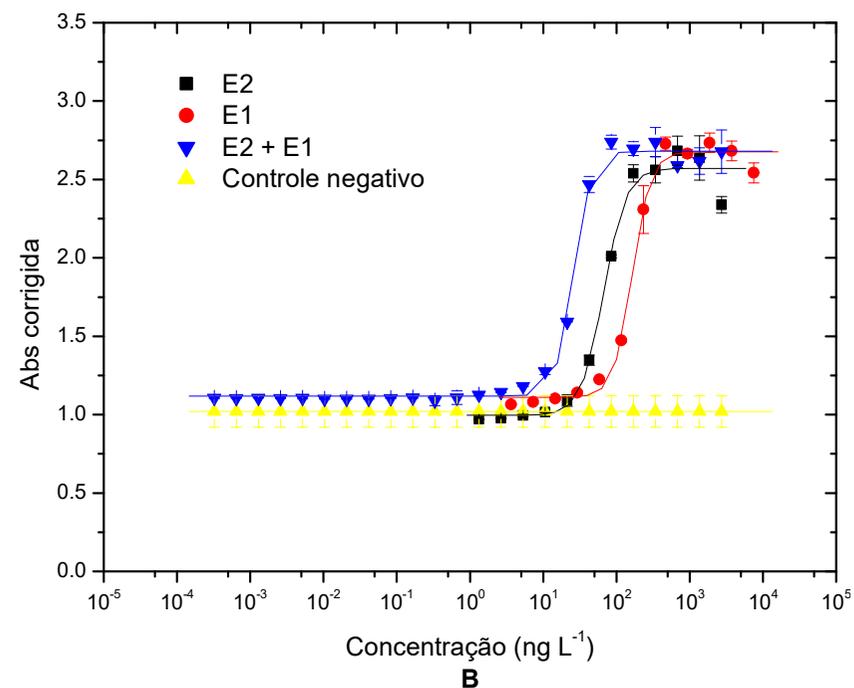
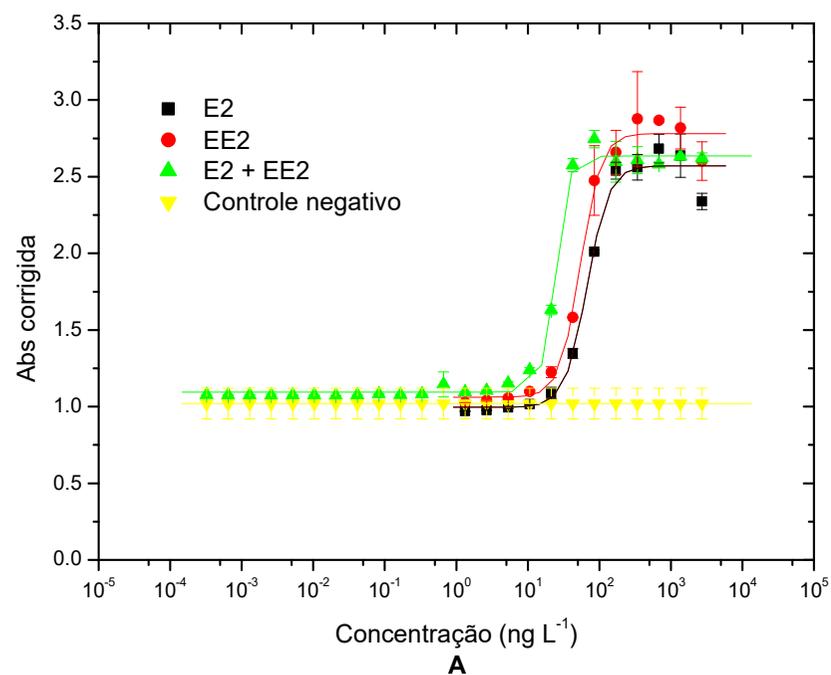
Os valores EQ-E2 observados das misturas binárias E2+EE2, E2 +E1 e EE2 +E1 foram estatisticamente maiores (valor p <0,05) do que os valores EQ-E2 estimados (Tabela 9 e APÊNDICE 3 e 4. Assim, para o mecanismo de ação do ensaio YES esses compostos apresentaram um efeito maior do que o aditivo nas concentrações testadas. Vale ressaltar que a interação entre os diferentes compostos pode depender do nível de dosagem da mistura e/ou da razão de dose, de modo que o efeito da mistura pode variar de acordo com a concentração testada, e ter um resultado dependente da dose (JONKER et al., 2005; LOUREIRO et al., 2009).

A Figura 25 apresenta as curvas dose resposta (de acordo com as concentrações apresentadas anteriormente na Tabela 5) das misturas e das monossoluções que foram utilizadas para o preparo destas.

Tabela 9 – ANOVA para valores de EQ-E2 observados e estimados das misturas analisadas com resultados estatisticamente significativos (p-valor < 0,05)

<b>Fonte</b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F-value</b>	<b>P- value</b>
E2+EE2					
Desvio do valor estimado	1	99,03	99,03	7,921	0,0374
Resíduos	5	62,51	12,5	-	-
E2+E1					
Desvio do valor estimado	1	192	192,04	11,52	0,0115
Resíduos	7	116,7	16,67	-	-
EE2+E1					
Desvio do valor estimado	1	131,84	131,84	12,996	0,00868
Resíduos	7	71,01	10,14	-	-

Figura 25 – Curvas dose-resposta das misturas e das monossoluções analisadas (A) E2 + EE2; (B) E2 + E1; (C) E2 + E3; (D) E2 + BPA; (E) EE2 + E1; (F) EE2 + E3; (G) EE2 + BPA; (H) E1 + E3; (I) E1 + BPA; (J) E2 + EE2 + E1 + E3; (K) (L) E2 + EE2 + E1 + E3 + BPA

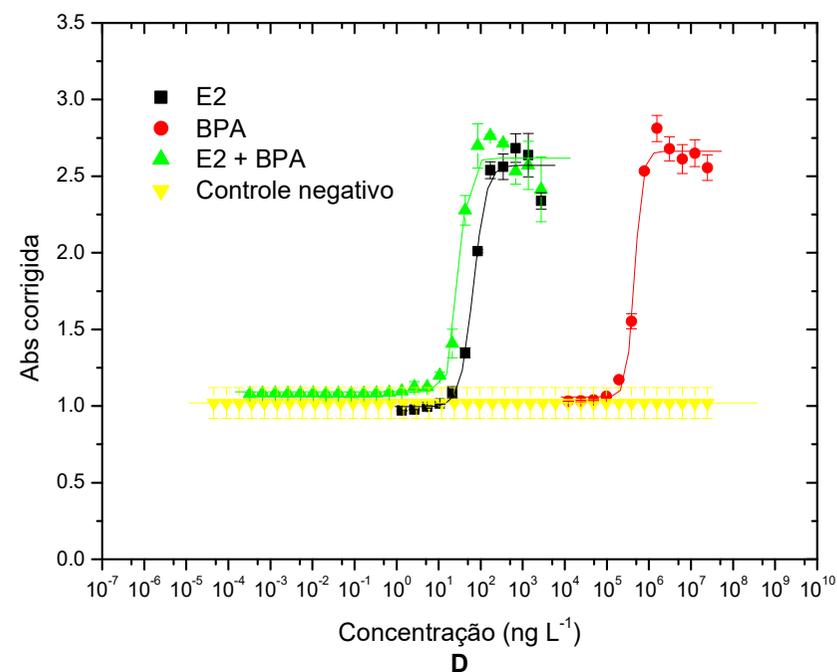
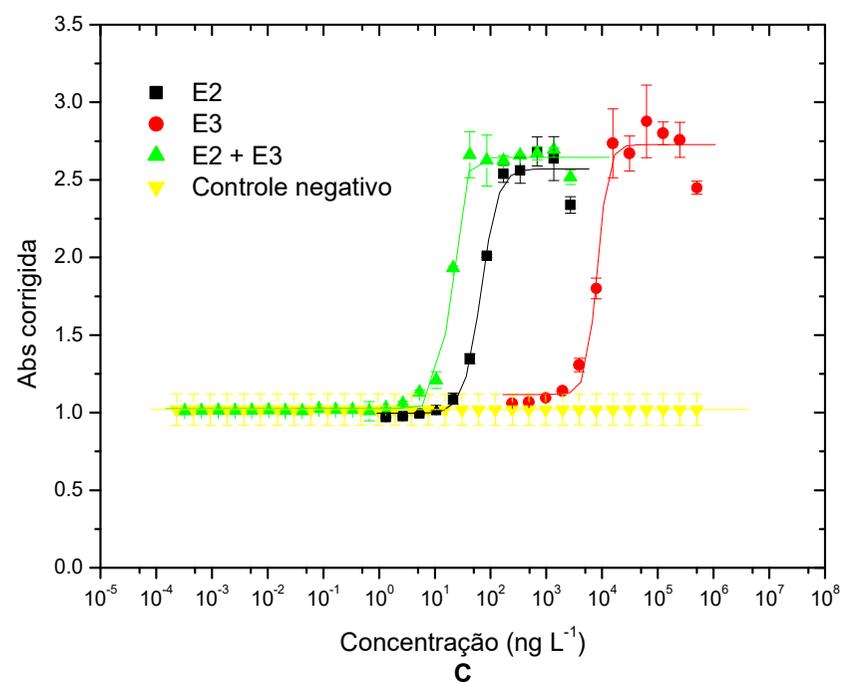


Legenda: E2 – 17 $\beta$ -estradiol, E1 – estrona, E3 – estriol, EE2 - 17 $\alpha$ -etinilestradiol, BPA – bisfenol-A.

*Continua*

Continuação

Figura 25 – Curvas dose-resposta das misturas e das monossoluções analisadas (A) E2 + EE2; (B) E2 + E1; (C) E2 + E3; (D) E2 + BPA; (E) EE2 + E1; (F) EE2 + E3; (G) EE2 + BPA; (H) E1 + E3; (I) E1 + BPA; (J) E2 + EE2 + E1 + E3; (K) (L) E2 + EE2 + E1 + E3 + BPA

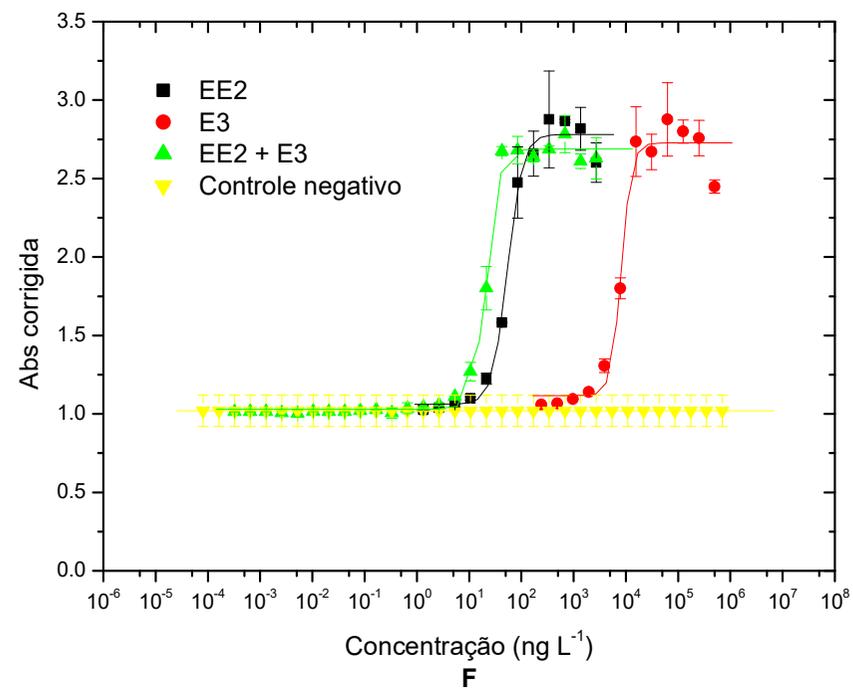
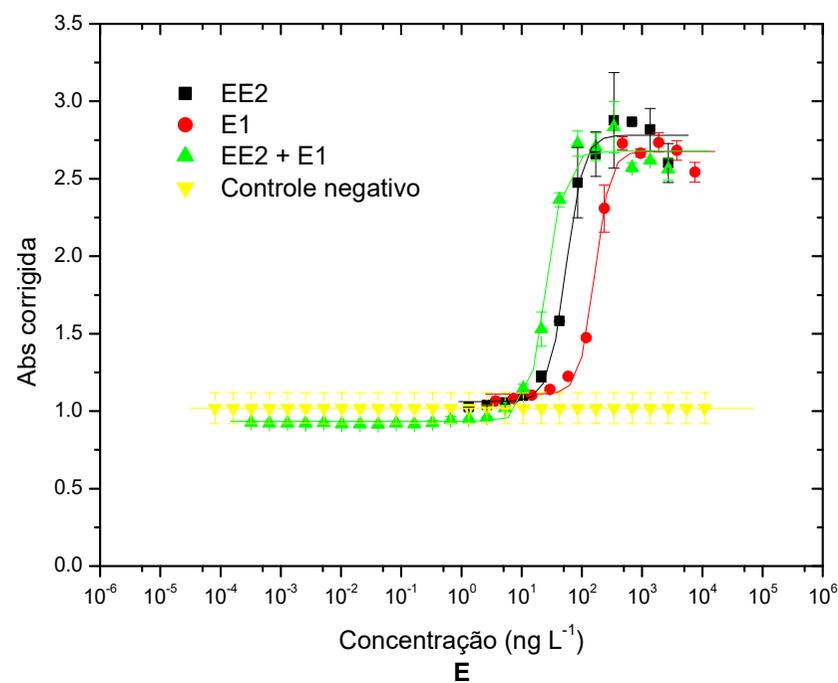


Legenda: E2 – 17 $\beta$ -estradiol, E1 – estrona, E3 – estriol, EE2 - 17 $\alpha$ -etinilestradiol, BPA – bisfenol-A.

Continua

Continuação

Figura 25 – Curvas dose-resposta das misturas e das monossoluções analisadas (A) E2 + EE2; (B) E2 + E1; (C) E2 + E3; (D) E2 + BPA; (E) EE2 + E1; (F) EE2 + E3; (G) EE2 + BPA; (H) E1 + E3; (I) E1 + BPA; (J) E2 + EE2 + E1 + E3; (K) (L) E2 + EE2 + E1 + E3 + BPA

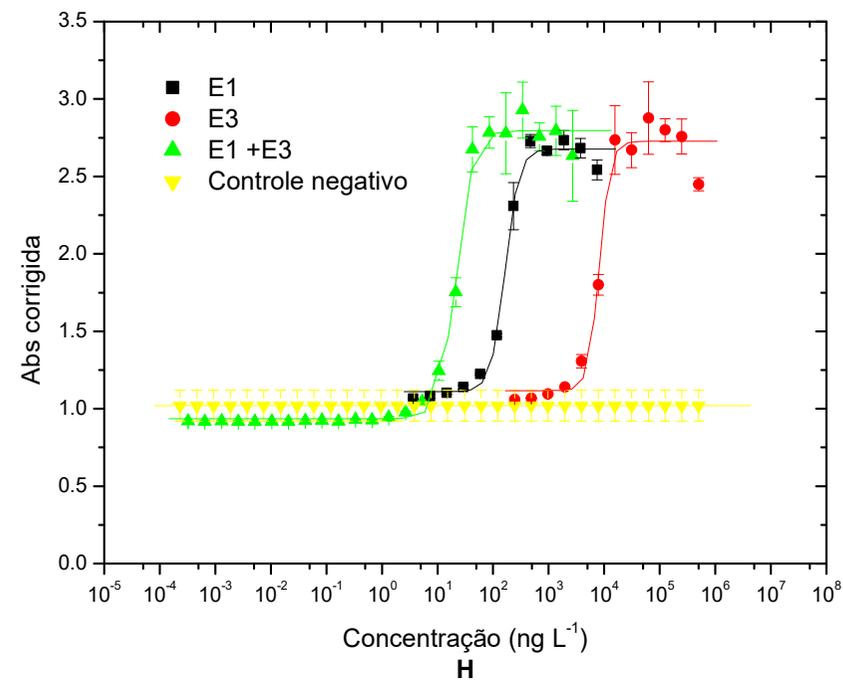
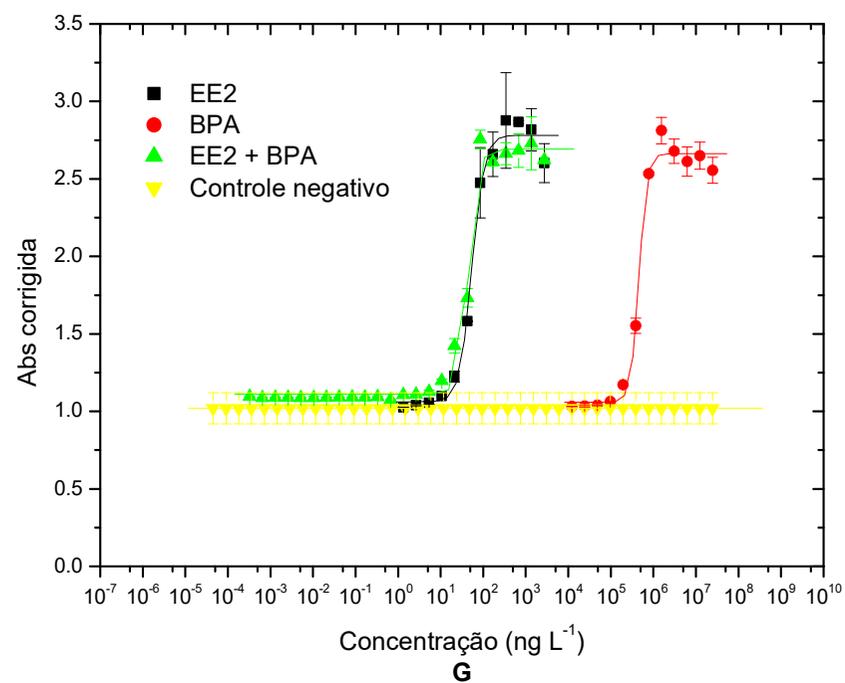


Legenda: E2 – 17 $\beta$ -estradiol, E1 – estrona, E3 – estriol, EE2 - 17 $\alpha$ -etinilestradiol, BPA – bisfenol-A.

Continua

Continuação

Figura 25 – Curvas dose-resposta das misturas e das monossoluções analisadas (A) E2 + EE2; (B) E2 + E1; (C) E2 + E3; (D) E2 + BPA; (E) EE2 + E1; (F) EE2 + E3; (G) EE2 + BPA; (H) E1 + E3; (I) E1 + BPA; (J) E2 + EE2 + E1 + E3; (K) (L) E2 + EE2 + E1 + E3 + BPA

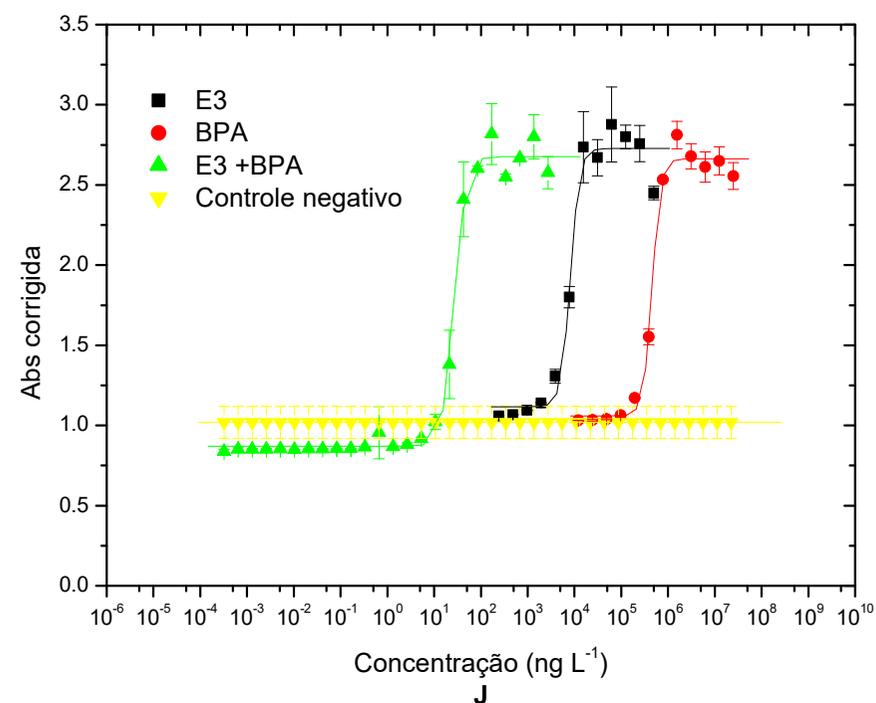
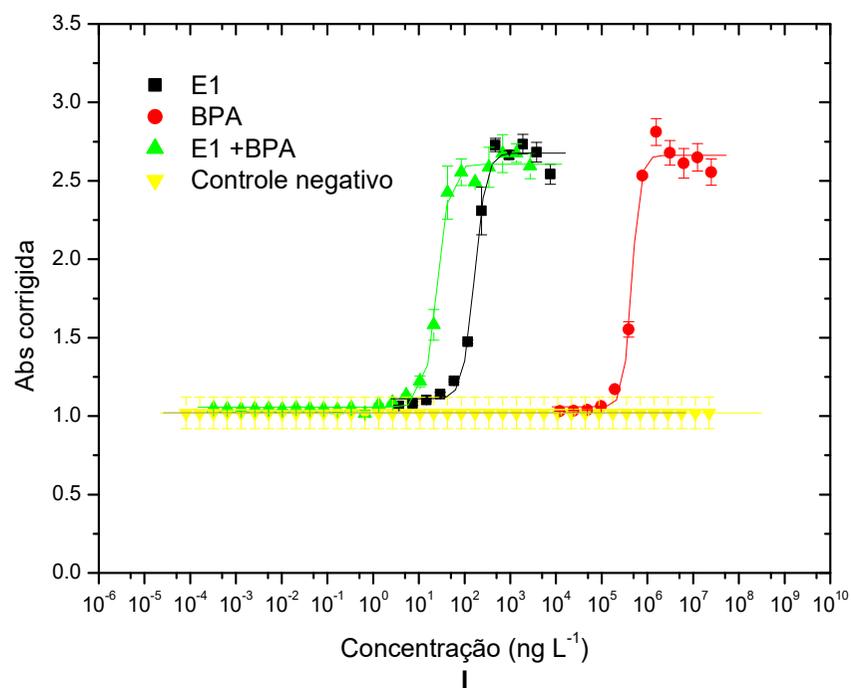


Legenda: E2 – 17 $\beta$ -estradiol, E1 – estrona, E3 – estriol, EE2 - 17 $\alpha$ -etinilestradiol, BPA – bisfenol-A.

Continua

Continuação

Figura 25 – Curvas dose-resposta das misturas e das monossoluções analisadas (A) E2 + EE2; (B) E2 + E1; (C) E2 + E3; (D) E2 + BPA; (E) EE2 + E1; (F) EE2 + E3; (G) EE2 + BPA; (H) E1 + E3; (I) E1 + BPA; (J) E2 + EE2 + E1 + E3; (K) (L) E2 + EE2 + E1 + E3 + BPA

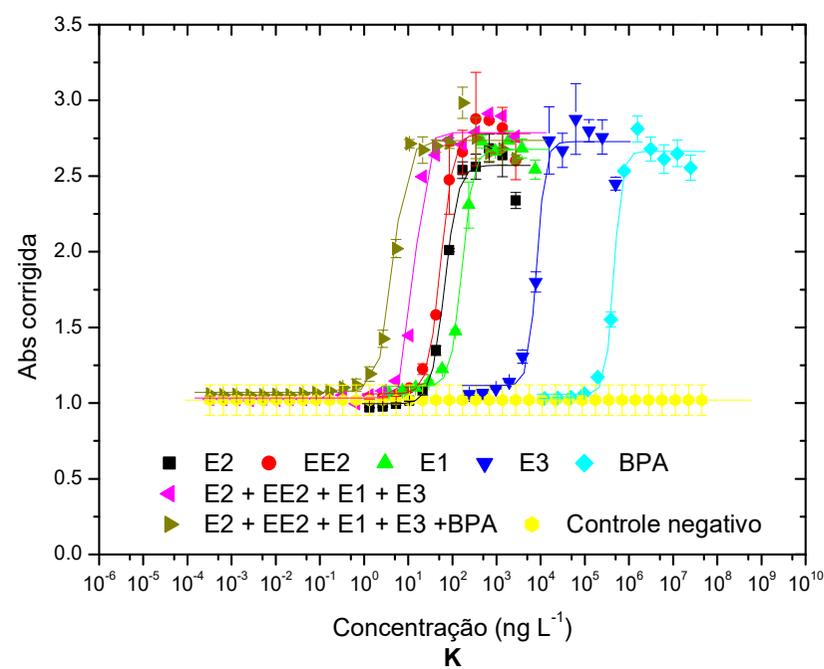


Legenda: E2 – 17 $\beta$ -estradiol, E1 – estrona, E3 – estriol, EE2 - 17 $\alpha$ -etinilestradiol, BPA – bisfenol-A.

Continua

Continuação

Figura 25 – Curvas dose-resposta das misturas e das monossoluções analisadas (A) E2 + EE2; (B) E2 + E1; (C) E2 + E3; (D) E2 + BPA; (E) EE2 + E1; (F) EE2 + E3; (G) EE2 + BPA; (H) E1 + E3; (I) E1 + BPA; (J) E2 + EE2 + E1 + E3; (K) (L) E2 + EE2 + E1 + E3 + BPA



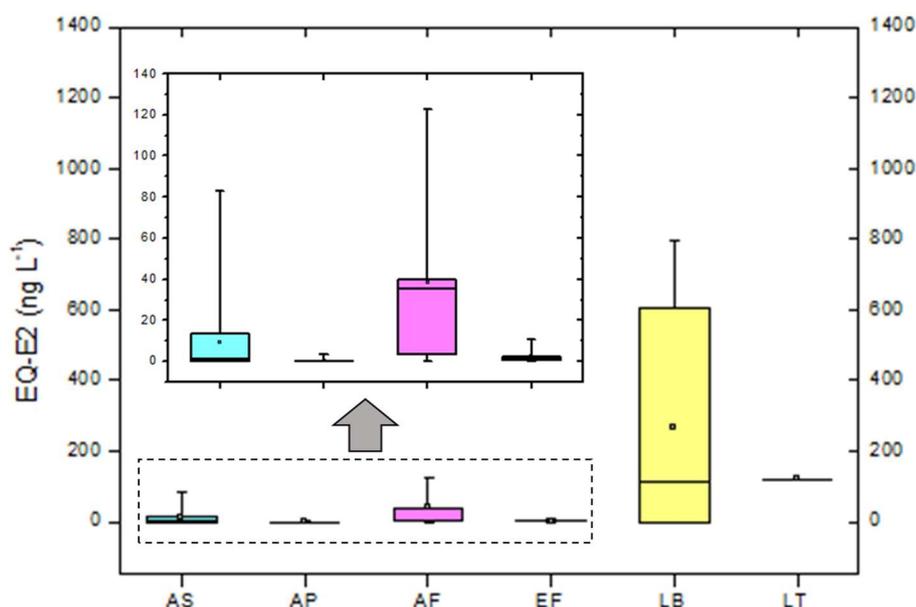
#### 4.2.3. Atividade estrogênica de amostras ambientais

Os métodos analíticos, normalmente empregados no monitoramento de matrizes ambientais, exigem um conhecimento prévio sobre as substâncias-alvo e, por razões técnicas e econômicas, não é possível analisar, detectar e quantificar todas as substâncias presentes nas amostras ambientais (WERNERSSON et al., 2015).

Por esse motivo, os métodos analíticos, normalmente, são aplicados apenas às substâncias regulamentadas e nocivas, enquanto o uso de um ensaio que quantifica a atividade estrogênica total considerando os efeitos das misturas pode funcionar como uma ferramenta financeiramente acessível e fornecer informações sobre o potencial efeito biológico de uma amostra ambiental.

A Figura 26 e o APÊNDICE 5 mostram a distribuição dos valores de EQ-E2 para as matrizes ambientais avaliadas neste estudo. Como esperado, as amostras de lixiviado bruto de aterro sanitário foram as que apresentaram maior faixa de EQ-E2.

Figura 26 – Distribuição em boxplot de valores EQ-E2 ( $\text{ng L}^{-1}$ ) para as frações dissolvidas das matrizes ambientais avaliadas (AS – água superficial, AP – água potável, AF – afluente de ETE, EF – efluente de ETE, LB – lixiviado bruto de aterro sanitário, LT – lixiviado tratado de aterro sanitário)



No APÊNDICE 5, também é possível visualizar a frequência e o valor máximo de citotoxicidade por matriz ambiental e, notoriamente, as amostras de sedimento e de material particulado obtido de água superficial foram as que apresentaram maior frequência de citotoxicidade. No entanto, é importante explicitar a heterogeneidade das amostras estudadas, onde cada amostra possui suas características inerentes, justificando os desvios nos resultados de EQ-E2 e na frequência de citotoxicidade encontrados.

As seções a seguir abordam a atividade estrogênica, mensurada pelo ensaio YES, de cada matriz individualmente e as respectivas dificuldades nas análises.

#### 4.2.3.1. Água potável

As amostras de água potável são as mais facilmente avaliadas através do ensaio YES, pois são previamente submetidas a um processo de tratamento, ainda que convencional, que diminui a ocorrência de potenciais interferentes na resposta do ensaio.

Todas as amostras avaliadas ( $n = 21$ ) foram provenientes de uma estação de tratamento convencional de água (ETA) que engloba as etapas de coagulação, floculação, sedimentação, filtração, desinfecção e correção de pH. A atividade estrogênica foi detectada e quantificada em apenas duas amostras, apresentando valores de EQ-E2 de 1,5 e 3,5 ng L<sup>-1</sup>. As demais amostras apresentaram resposta inferior ao LD e nenhuma amostra foi citotóxica (APÊNDICE 6).

Xiao et al. (2016) também avaliaram amostras de água potável de uma ETA convencional na China e relataram encontrar EQ-E2 na faixa de <LD à 0,363 ng L<sup>-1</sup>. Dias et al. (2015) avaliaram a atividade estrogênica em águas brasileiras com preparo de amostras, incluindo filtração através de membrana de fibra de vidro de 1,2 µm e membrana de acetato de celulose de 0,45 µm, e relataram valores máximos de EQ-E2 de 10 e 0,9 ng L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os resultados encontrados na literatura corroboram com os encontrados neste estudo, demonstrando a eficácia da implementação e desenvolvimento da metodologia do ensaio YES aplicada.

A matriz água potável, como esperado, foi a que apresentou menores dificuldades para avaliação através do ensaio YES. Amostras de água potável não possuem material particulado,

não carecendo obrigatoriamente de filtração no preparo da amostra. No entanto, a etapa de concentração é essencial devido aos baixos níveis de atividade estrogênica presente nessa matriz. Além disso, essa matriz necessita da extração de um volume maior que as demais.

A metodologia de concentração empregada – EFS – foi de rápido desenvolvimento e em nenhum momento houve saturação do cartucho. O fator de concentração usado foi de 500 vezes e este foi considerado adequado para a sensibilidade do método YES.

Em relação à análise dos resultados do ensaio, não é comum que amostras de água potável apresentem citotoxicidade e, portanto, todas as células inoculadas no ensaio, geralmente, permanecem viáveis, no entanto, a avaliação da citotoxicidade pela Eq. 5 não deve ser descartada. Desse modo, após a aplicação da Eq. 5 para as amostras de água potável analisadas, comprovou-se que nenhuma delas apresentou citotoxicidade.

#### 4.2.3.2. Água superficial

Este estudo apresenta resultados de análises de águas coletadas em dois rios localizados no Rio de Janeiro: uma fonte de água para abastecimento público de ETA (Rio Guandu) e um córrego urbano que recebe descarga de esgoto sanitário (Rio Maracanã). A atividade estrogênica das águas superficiais pode variar substancialmente de acordo com a classe do rio, e, portanto, o fator de concentração a ser empregado também pode sofrer variações. No entanto, neste estudo, foi empregado o mesmo fator de concentração (500 x) para os dois casos.

O percentual de 4% das amostras apresentou citotoxicidade na fase dissolvida, porém não houve impedimento do cálculo da atividade estrogênica, pois a análise de diferentes diluições permitiu que a toxicidade fosse eliminada sem dirimir a estrogenicidade da amostra. Amostras do rio Maracanã apresentaram EQ-E2 entre 15 e 40 ng L<sup>-1</sup> e no rio Guandu 26% das amostras ficaram abaixo do LD do método, enquanto 74% das amostras foram estrogênicas, apresentando EQ-E2 na faixa de 0,28 a 83 ng L<sup>-1</sup> (APÊNDICE 6).

Dias et al. (2015) também analisaram água superficial do Rio Guandu e encontraram valores de EQ-E2 inferiores aos desse estudo, o valor máximo encontrado foi de 16 ng L<sup>-1</sup>, no

entanto o resultado das análises de águas superficiais é sempre muito dinâmico, o que pode justificar a diferença de resultados.

Algumas dificuldades foram encontradas durante a realização das etapas de filtração e EFS das amostras do Rio Maracanã. Houve maior demanda de tempo quando comparado as amostras de água superficial do Rio Guandu, provavelmente associado a maior concentração de sólidos suspensos.

Um meio de reduzir essa maior demanda de tempo seria diminuir o fator de concentração da amostra. Wenzel et al. (2003) utilizam a turbidez como critério para a decisão do fator de concentração a ser empregado, o que justificaria a redução do fator de concentração dessas amostras do Rio Maracanã, tal possibilidade é corroborada com as concentrações de atividade estrogênica encontradas.

#### 4.2.3.3. Afluente e efluente de ETE

Os afluentes da ETE avaliados tiveram atividade estrogênica variando de <LD a 123 ng L<sup>-1</sup> de EQ-E2, 22% dessas amostras apresentaram valores de EQ-E2 abaixo do LD do método e 20% das amostras induziram a citotoxicidade, inibindo o crescimento da levedura em até 92,5% nas maiores concentrações analisadas. Os efluentes da ETE analisados apresentaram atividade estrogênica variando de <LD a 11 ng L<sup>-1</sup> de EQ-E2, 12,5 % das amostras ficaram abaixo do LD do método e nenhuma das amostras foi citotóxica (APÊNDICE 6).

Os efeitos tóxicos de algumas amostras podem levar à redução das células viáveis e à redução do sinal mensurável, conseqüentemente, os efeitos estrogênicos de uma amostra podem ser mascarados por efeitos tóxicos agudos, levando a resultados falso-negativos. No entanto, para as amostras que apresentaram citotoxicidade, este interferente foi superado pela diluição das amostras, não impedindo a detecção e quantificação da estrogenicidade em nenhum caso. Tal fato, corrobora para a aplicabilidade da metodologia de *clean up* empregada e do uso do cartucho strata-SAX para a mitigação e/ou remoção dos possíveis interferentes presentes nessa matriz ambiental.

Para a interpolação das curvas dose-resposta foi necessário evitar o uso de uma diluição onde ocorria o efeito tóxico, pois subestimaria a potência estrogênica da amostra, reduzindo o seu EQ-E2.

Ressalta-se que caso o nível de citotoxicidade das amostras impossibilite a quantificação da atividade estrogênica, uma etapa de pré-tratamento da amostra pode ser aplicada. Citulski e Farahbakhsh (2012) relataram elevados níveis de citotoxicidade gerados por matrizes ambientais e aplicaram e testaram algumas técnicas de preparo de amostras para mitigar esses efeitos. Para os afluentes e efluentes de ETE utilizaram um processamento de cobre para remoção de enxofre e um *clean up* adicional usando sílica e alumina, ambos não ocasionaram a perda de E2. Para extratos de lodo de esgoto e biossólidos, a estabilização da amostra através de métodos como autoclavagem, liofilização e tratamento com formaldeído foram considerados prejudiciais para o ensaio YES e a secagem com calor foi recomendada para prevenir a citotoxicidade e a degradação de substâncias estrogênicas.

#### 4.2.3.4. Lixiviado bruto e tratado de aterro sanitário

Neste estudo, as amostras de lixiviado de aterro sanitário foram as mais delicadas para a análise pelo ensaio YES devido à sua complexidade. As amostras de lixiviado bruto apresentaram valores de atividade estrogênica na faixa <LD - 794 ng L<sup>-1</sup> de EQ-E2, enquanto a amostra de lixiviado tratado apresentou 120 ng L<sup>-1</sup> de EQ-E2 (APÊNDICE 6).

Não foi possível quantificar a estogenicidade da fase dissolvida de todas as amostras de lixiviado, pois algumas delas apresentaram resultados abaixo do LD. Aparentemente, isso não é coerente, uma vez que a detecção e quantificação de xenoestrogênios nesta matriz são relatadas na literatura. Por exemplo, Kamata et al. (2011) quantificou altos valores de compostos estrogênicos em lixiviados de aterros sanitários do Japão, até 105 µg L<sup>-1</sup> de BPA e 2 µg L<sup>-1</sup> de nonilfenol o que é traduzido em pelo menos 77 ng L<sup>-1</sup> e 1060 ng L<sup>-1</sup> em termos de EQ-E2, respectivamente, considerando a PR estabelecida para o BPA e para o nonilfenol neste estudo (Tabela 8).

Sugere-se que o uso do ensaio YES para esta matriz complexa pode exigir um pré-tratamento otimizado da amostra e remoção de interferentes para resultados mais precisos. Há poucos estudos publicados que utilizaram o ensaio YES para a avaliação de lixiviados de aterro, provavelmente devido às adversidades associadas à essa matriz.

Pereira et al. (2018) utilizaram o ensaio YES para a análise desta matriz e Kawagoshi et al. (2003) usaram um ensaio de levedura semelhante (*Yeast two-hybrid assay*). Ambos os estudos enfrentaram dificuldades na quantificação da atividade estrogênica e relataram que o maior desafio está na presença de inúmeros compostos capazes de bloquear os receptores de estrogênio nas células e induzir uma resposta falso-negativa. Além disso, Kawagoshi et al. (2003) sugeriram que os resultados abordaram apenas parcialmente a atividade estrogênica real dos lixiviados e as etapas de pré-tratamento da amostra foram insuficientes, uma vez que a quantificação dos xenoestrogênios, por métodos cromatográficos, foi muito maior em comparação ao seu efeito observado no ensaio.

Inesperadamente, nenhuma amostra apresentou citotoxicidade, o que incentiva o estudo da influência dessas amostras no crescimento dessa estirpe, pois elevados valores de toxicidade são relatados para essa matriz ambiental em bioensaios de ecotoxicidade (LUO et al., 2020).

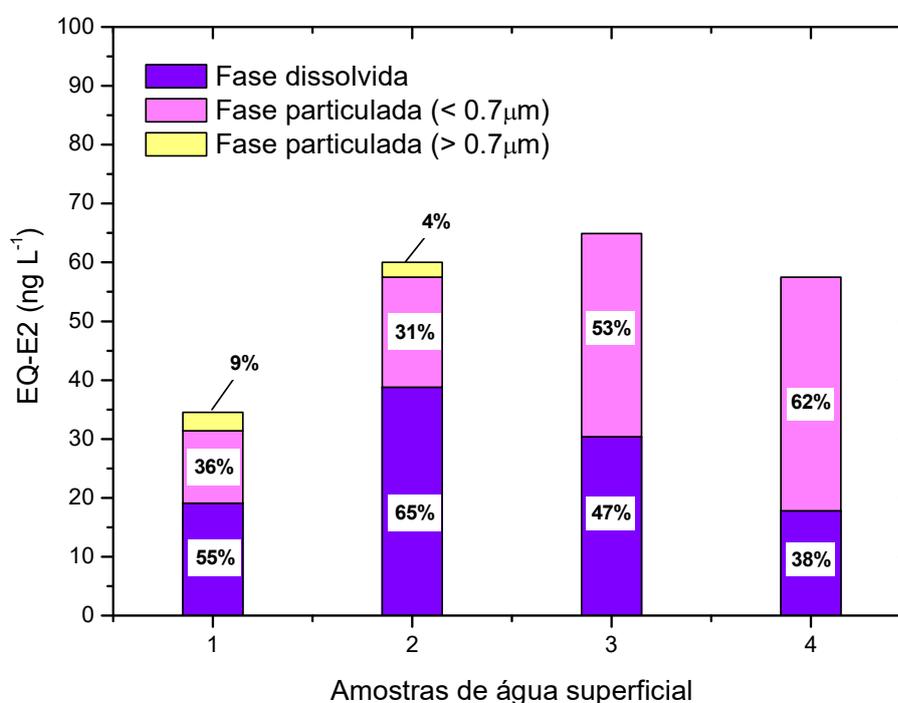
#### 4.2.3.5. Material particulado e amostras não concentradas

Algumas propriedades físico-químicas das substâncias estrogênicas, como solubilidade, massa molar e coeficientes de partição ( $k_{ow}$  e  $k_{oc}$ ), sugerem grande afinidade desses compostos por sólidos orgânicos suspensos em matrizes ambientais aquosas (BIRKETT e LESTER, 2003).

As substâncias estrogênicas geralmente têm coeficientes de partição octanol / água moderados a altos e solubilidades relativamente baixas. Estrogênios esteroidais, como E2, E1, E3 e EE2, têm valores de  $\log k_{ow}$  variando entre 2,81 e 4,15 e solubilidades na faixa de 4,8-13  $\text{mg L}^{-1}$ , o que indica um caráter hidrofóbico e uma tendência de fracionamento entre as fases particulada e dissolvida em matrizes aquosas (VEGA-MORALES et al., 2013; YARAHMADI et al., 2018). Por esse motivo, a atividade estrogênica também foi avaliada na fração particulada de águas superficiais e amostras de lixiviado de aterro.

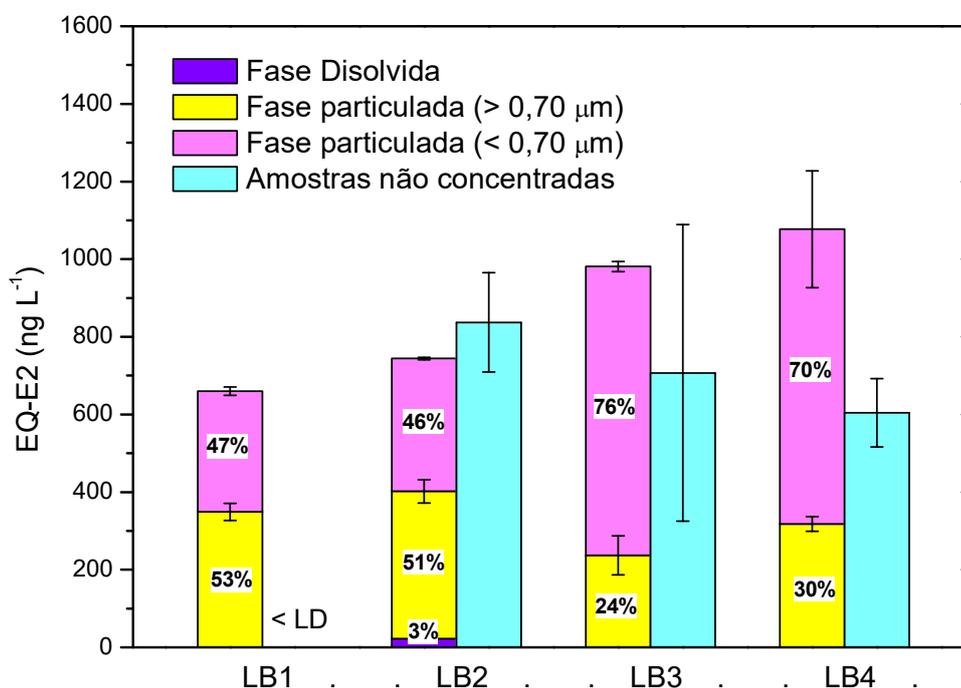
Considerando a soma da atividade estrogênica dissolvida e associada ao material em suspensão, o EQ-E2 total variou de 35 a 65 ng L<sup>-1</sup> nas amostras de águas superficiais analisadas e 31% a 62% desses valores foram associados ao material em suspensão menor que 0,7 µm. Por outro lado, as substâncias adsorvidas por partículas maiores que 0,7 µm foram responsáveis por até 9% da atividade estrogênica total, mas a citotoxicidade impediu o cálculo do EQ-E2 em metade desses extratos (Figura 27 e APÊNDICES 6 e 7).

Figura 27 – Valores totais de EQ-E2 de amostras de água superficial: distribuição percentual entre as fases particulada e dissolvida



As amostras de lixiviado apresentaram valores totais (atividade estrogênica associada a fase dissolvida + atividade estrogênica associada às partículas) de EQ-E2 na faixa de 661 - 1077 ng L<sup>-1</sup>, principalmente devido à estrogenicidade associada às partículas (APÊNDICES 6 e 7). A fração de sólidos suspensos finos (< 0,7 µm) induziu de 46% a 76% da atividade estrogênica total e a fração de partículas grandes (> 0,7 µm) induziu de 24% a 53% do valor total (Figura 28). Em contraste, apenas 3% (22 ng L<sup>-1</sup>) do total de EQ-E2 foi quantificado na fase dissolvida de uma dessas amostras.

Figura 28 – Valores totais de EQ-E2 de amostras de lixiviado bruto de aterro sanitário: amostras não concentradas e distribuição percentual entre as fases particulada e dissolvida



O conhecimento dos mecanismos de interação das substâncias estrogênicas com as diferentes fases (dissolvida e particulada) nas matrizes ambientais e o decorrente fracionamento são informações úteis para, além de avaliar a ocorrência de substâncias estrogênicas, otimizar seus processos de remoção. Desse modo, um bioensaio que além de possuir um mecanismo específico, possibilite o conhecimento da porcentagem de estrogenicidade associada a cada fase da amostra, possibilita a escolha da técnica de tratamento mais adequada às características da amostra (ARGOLO et al., 2021).

As mesmas amostras de lixiviado de aterro também foram testadas sem nenhuma etapa de filtração e EFS (item 4.1.6.) e os resultados foram comparados com a soma da estrogenicidade associada a: fração dissolvida + fração de sólidos suspensos finos (< 0,7 μm) + fração de partículas grandes (> 0,7 μm). Essa comparação foi realizada com o desígnio de avaliar se os resultados eram coerentes entre si.

O EQ-E2 observado das amostras não filtradas e não concentradas variou de 604 a 837 ng L<sup>-1</sup> e abaixo do LD para uma amostra (APÊNDICE 7). Contudo, o lixiviado é uma matriz

com elevado teor de matéria orgânica e o mecanismo de interação dos estrogênios com a matéria orgânica pode resultar na formação de complexos que não são reconhecidos pelo receptor de estrogênio. Desta forma, parte dos estrogênios presentes na matriz podem não se encontrar biodisponíveis no momento do ensaio, havendo um efeito de antagonismo aparente causado pela matéria orgânica (MA e YATES, 2018; NEALE et al., 2015). Isso pode justificar resultados abaixo do LD para a fase dissolvida e para a análise sem extração em fase sólida das amostras de lixiviado. Assim como, também pode explicar a diferença encontrada entre o resultado da soma das frações particuladas + dissolvidas e o resultado encontrado para as amostras não concentradas (Figura 28).

#### 4.2.3.6. Sedimento

Compostos não estrogênicos presentes nos sedimentos podem ser coextraídos com substâncias-alvo, o que dificulta a detecção e quantificação da atividade estrogênica nas amostras por meio do ensaio YES. Além disso, esses compostos podem causar citotoxicidade para células de levedura e induzir uma resposta falso-negativa (FRISCHE et al., 2009).

A inibição do crescimento da levedura ocorreu em 61% das amostras testadas, mas em 29% desses casos o efeito foi superado com a diluição da amostra. A quantificação do EQ-E2 foi possível em 46% das amostras e os resultados variaram de 0,08 a 12 ng g<sup>-1</sup> (APÊNDICE 8).

A quantificação da estrogenicidade foi possível em 27% das amostras de sedimentos provenientes de ambientes salinos. Hettwer et al (2018) e Gehrman et al. (2016) relataram que para alguns bioensaios a salinidade pode ser um fator crítico. No entanto, para afirmar que os valores encontrados abaixo do LD do método estão associados às questões salinas, seria necessário a realização de um teste de tolerância à salinidade. Vale ressaltar que nem todas as amostras com resultados abaixo do LD apresentaram citotoxicidade, o que sugere a não ocorrência da influência desse fator para todas as amostras analisadas.

Não obstante, Viganò et al. (2008) avaliaram sedimentos de rios com o ensaio YES e relataram atividade estrogênica máxima de 15,6 ng g<sup>-1</sup> e afirmaram que este bioensaio foi robusto para a investigação da estrogenicidade dessa matriz.

#### 4.2.4. Atividade antiestrogênica de amostras ambientais

A avaliação da atividade antiestrogênica foi realizada adicionando E2 aos extratos das amostras diluídas. A partir da concentração de E2 adicionada e conhecida, avaliou-se a redução da atividade estrogênica ocasionada pela amostra. Amostras de água potável, água superficial e de lixiviado de aterro sanitário foram avaliadas para este *endpoint*. A fase dissolvida, dessas amostras, havia sido previamente analisada e os resultados encontrados foram abaixo do LD do método, exceto para uma amostra de lixiviado (LB 2). Elaborou-se a hipótese do resultado encontrado estar atrelado à presença de substâncias antagônicas que estariam mascarando os resultados das análises, principalmente nas amostras de lixiviado, que supostamente possuem elevadas concentrações de substâncias antiestrogênicas (KAWAGOSHI ET AL., 2003; PEREIRA et al., 2018).

Nenhuma das 6 amostras de água potável analisadas apresentaram resposta positiva para efeitos antagônicos. Por outro lado, foi observada a presença de compostos redutores da atividade estrogênica do E2 em uma amostra de água superficial (n=6) (Figura 29) e nas quatro amostras de lixiviado testadas (n=4) (Figura 30).

Figura 29 – Curvas dose-resposta do extrato de amostra de água superficial (AS) testado com e sem adição de E2 na microplaca para avaliação da atividade antiestrogênica

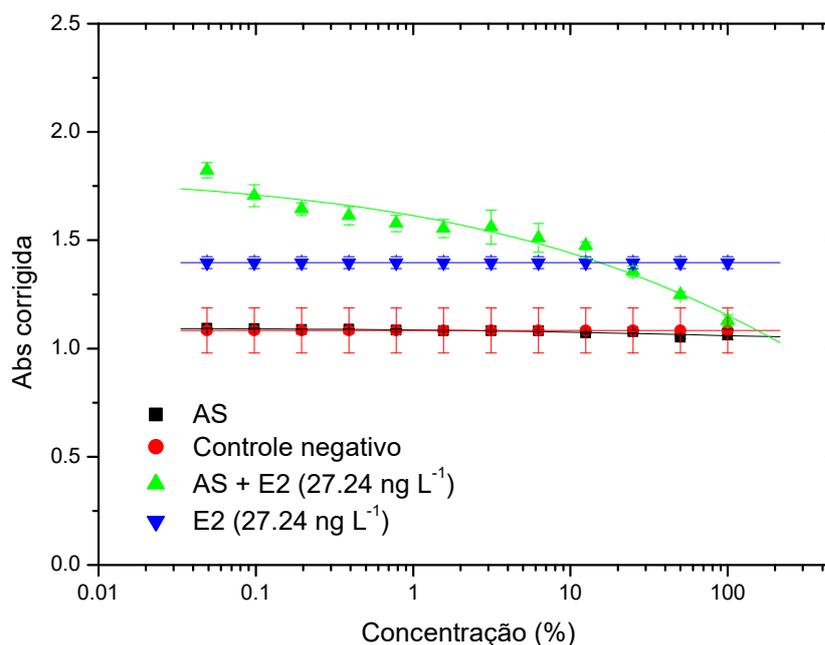
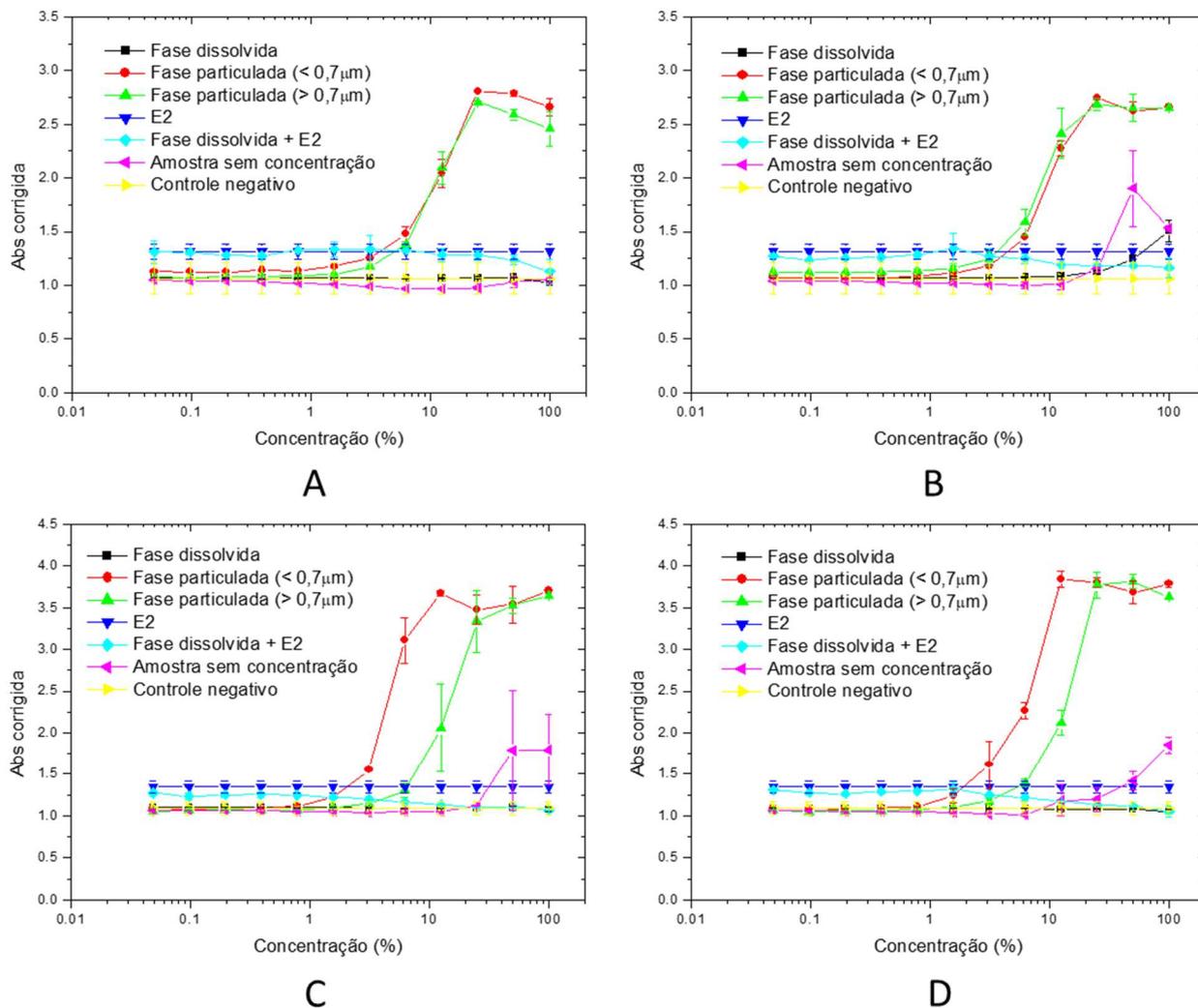


Figura 30 – Curva dose-resposta de amostras de lixiviado bruto de aterro sanitário: (A) LB 1, (B) LB 2, (C) LB 3, (D) LB 4



A inibição do efeito estrogênico e, portanto, o efeito antiestrogênico pode ser visualizado pelo decaimento da curva dose-resposta das amostras com a adição do E2, onde as maiores concentrações das amostras deveriam apresentar, minimamente, a estrogenicidade referente à concentração de E2 adicionada.

Na Figura 29 e na Figura 30 (A, C e D) é possível visualizar que os extratos da fase dissolvida das amostras não induziram nenhuma resposta estrogênica, bem como também não apresentaram citotoxicidade. Porém, quando analisados na presença de uma concentração

conhecida de E2, ocorreu um decaimento nas absorvâncias das maiores concentrações testadas, indicando a supressão da estrogenicidade do E2 adicionado.

Complementarmente, as menores concentrações testadas da amostra de água superficial (Figura 29) apresentaram um aumento da absorvância evidenciando o mascaramento do potencial estrogênico da amostra por compostos antagonísticos.

Por conseguinte, compostos antagonísticos bloquearam inicialmente a estrogenicidade da amostra original de água superficial, bem como a concentração de E2 adicionada em ambas as matrizes analisadas. Tal análise evidencia a provável presença de compostos antiestrogênicos em ambas as matrizes. Desse modo, recomenda-se que a atividade antiestrogênica seja analisada para as amostras cuja a atividade estrogênica encontrada tenha sido abaixo do LD do método.

Adicionalmente, considerando a hipótese da presença de compostos antagonísticos associados também às fases particuladas das amostras de lixiviado de aterro sanitário, pode ser que a atividade estrogênica referente aos sólidos suspensos seja ainda maior do que a apresentada na Figura 28 e na Figura 30.

#### 4.2.5. Consolidação dos resultados da Fase 2

Para a minimização de fatores interferentes na realização do ensaio YES para a análise de compostos orgânicos, misturas e amostras ambientais deve-se seguir um protocolo, como o elaborado na fase 1 deste estudo e explicitado no APÊNDICE 2.

A análise de compostos isolados não prediz o efeito desses compostos na mistura em que são encontrados no meio ambiente, visto que muitos compostos não possuem efeito aditivo. A citar as misturas que foram estudadas nessa pesquisa e apresentaram efeito maior que aditivo: E2+EE2, E2+E1, EE2+E1.

O estudo da atividade estrogênica de matrizes ambientais pelo ensaio YES deve considerar o devido preparo das amostras de acordo com as características inerentes a elas. A depender das propriedades das amostras, a análise da estrogenicidade e antiestrogenicidade, das fases dissolvida e particulada deve ser levada em consideração.

Ambas as matrizes, água superficial e lixiviado bruto de aterro sanitário, analisadas quanto a atividade estrogênica da fase particulada apresentaram resultados positivos, indicando a importância do estudo da estrogenicidade associada aos sólidos suspensos e não somente à fase dissolvida. Ademais, ambas as matrizes também apresentaram atividade antiestrogênica, demonstrando também a relevância dessa análise para o conhecimento do efeito biológico das misturas no meio ambiente.

As amostras de lixiviado bruto de aterro sanitário foram as que apresentaram maior faixa de EQ-E2 na fase dissolvida, assim como também apresentaram atividade estrogênica na fase particulada e atividade antiestrogênica.

A maior frequência de citotoxicidade foi associada às amostras de sedimento e de material particulado. Somente nas amostras de sedimento houveram casos em que foi encontrado citotoxicidade e não foi possível quantificar a atividade estrogênica, nas demais matrizes, a citotoxicidade foi sempre superada com a diluição e com o preparo empregado na amostra em questão. Nessas amostras em que ocorreram citotoxicidade e não foi possível quantificar a atividade estrogênica, não se pode afirmar que esta não existe, pois pode ter sido mascarada pelo efeito tóxico agudo da amostra.

#### **4.3. Recomendações para a implementação e execução do ensaio YES**

O tempo de crescimento do inóculo da levedura a ser usado no ensaio pode influenciar no crescimento das células durante a incubação do ensaio, por isso a importância do conhecimento da curva de crescimento da estirpe utilizada.

Fatores como a densidade celular e tempo de incubação do ensaio podem interferir na sensibilidade do método (LD e LQ), sendo fundamental o uso do fator de concentração da amostra adequado à sensibilidade do ensaio atingida.

A concentração de CPRG adicionada ao meio de análise do ensaio também pode ser um fator de interferência no resultado do ensaio, pois a insuficiência de moléculas de CPRG para ser degradada pela  $\beta$ -galactosidase no ensaio pode subestimar a estrogenicidade da amostra.

O conhecimento da recuperação do método utilizado (incluindo filtração, EFS e ensaio) também é importante pois a metodologia empregada pode estar subestimando a atividade estrogênica das amostras sendo necessário a otimização da metodologia de preparo das amostras.

A análise de soluções aquosas deve ser realizada com cautela pois há maior dificuldade na pipetagem das amostras devido a maior viscosidade da água quando comparada à solventes. A presença de sólidos suspensos em amostras aquosas também dificulta essa análise. Essas condições podem ocasionar maiores desvios entre as duplicatas, sendo necessário que o operador tenha o devido treinamento para a realização dessa pipetagem.

O uso de qualquer reagente sem o devido grau de pureza recomendado pode interferir nos resultados do ensaio. Todos os reagentes devem ser de alto teor de pureza, desde os constituintes das soluções do ensaio, os padrões e até mesmo os solventes utilizados, os quais devem ser grau HPLC.

No que tange à citotoxicidade promovida por algumas amostras ambientais, esta muitas vezes, pode ser superada com a diluição das amostras. Vale ressaltar que para a quantificação da atividade estrogênica de amostras citotóxicas é necessário a utilização de uma diluição que não tenha ocorrido o efeito tóxico, caso contrário este efeito pode subestimar ou, até mesmo, inviabilizar a mensuração da estrogenicidade devido à redução de células viáveis no ensaio.

Contaminação por outros organismos, geralmente bactérias, pode ser mensurada através do controle negativo. No entanto, o preparo do ensaio em fluxo laminar, o uso de material estéril descartável ou autoclavado (no caso de vidros), os devidos cuidados como o uso de luva nitrílica (pois a luva de látex pode conter compostos estrogênicos em sua composição) e a lacração da placa de ensaio com fita crepe para a incubação em estufa reduzem a possibilidade desse interferente.

Para saber se a mensuração da atividade estrogênica se refere ao total presente na amostra deve-se sempre relatar qual preparo foi realizado na amostra, pois desse modo possibilita o conhecimento de qual fase da amostra está sendo analisada (dissolvida, particulada ou as duas juntas – amostras sem concentração). Caso a atividade estrogênica não seja encontrada, recomenda-se ainda a análise da atividade antiestrogênica pois esta pode estar bloqueando a percepção da estrogenicidade da amostra, ocasionando falso-negativo a resposta do ensaio.

Além dos fatores estudados, a norma ISO 19040-1 de 2018 cita a coloração ou a turbidez das amostras ambientais como um possível interferente do ensaio, no entanto quando se realiza o ensaio com a etapa de EFS e permitindo a evaporação da alíquota da amostra adicionada na placa de ensaio, esses fatores são minimizados, não interferindo na mensuração da densidade celular e nem na quantificação do CPR (produto de degradação do CPRG).

Os fatores de interferência estudados na fase 1 permitiram a elaboração de um protocolo otimizado para o ensaio YES (APÊNDICE 2) e, portanto, as dificuldades para a mensuração da atividade estrogênica de amostras ambientais, compostos orgânicos e misturas na fase 2 desse estudo foram minimizadas. A Tabela 10 apresenta uma compilação das recomendações e soluções para as possíveis interferências na implementação e execução do ensaio *in vitro* *Yeast Estrogen Screen* (YES) para análise de estrogenicidade em amostras ambientais, compostos orgânicos e misturas

Tabela 10 – Recomendações e soluções para as possíveis interferências na implementação e execução do ensaio *in vitro Yeast Estrogen Screen* (YES) para análise de estrogénicidade em amostras ambientais, compostos orgânicos e misturas

<b>Fator de interferência</b>	<b>Interferência</b>	<b>Recomendação e solução</b>
Tempo de crescimento do inóculo da levedura a ser usado no ensaio	Crescimento não adequado das células durante a incubação do ensaio → diminuição da sensibilidade do método	O uso da fase log ( $24 \pm 4$ h de crescimento) para a inoculação da levedura no ensaio garante o melhor crescimento das células durante a incubação do ensaio
Densidade celular inicial no ensaio	Variação na CE50, LD e LQ do ensaio	Estipular a densidade celular a ser usada
Tempo de incubação do ensaio	Diminuição do tempo de incubação → diminuição da sensibilidade do método	Adequação do tempo de incubação de acordo com as características da amostra
LD e LQ	Sensibilidade do método não compatível com a amostra a ser analisada	Aumentar o fator de concentração da amostra
Concentração de CPRG no ensaio	Insuficiência de moléculas de CPRG para ser degradada pela $\beta$ -galactosidase no ensaio → subestimação da estrogénicidade	Uso de uma concentração adequada – $100 \text{ mg L}^{-1}$ no meio de análise
Eficiência de Recuperação do método de preparo da amostra	Subestimação da atividade estrogénica	Otimização da metodologia de preparo da amostra
Análise de solução aquosa	Dificuldades na pipetagem, maior viscosidade que solvente	Treinamento do operador

*Continua*

Continuação

Tabela 10 – Recomendações e soluções para as possíveis interferências na implementação e execução do ensaio *in vitro* *Yeast Estrogen Screen* (YES) para análise de estrogenicidade em amostras ambientais, compostos orgânicos e misturas e suas devidas soluções

<b>Fator de interferência</b>	<b>Interferência</b>	<b>Recomendação e solução</b>
Reagente sem o devido grau de pureza	Falso-positivo no ensaio	Uso de reagentes alta pureza (grau HPLC para solventes, > 98% de pureza para reagentes sólidos e água ultrapura)
Citotoxicidade	Redução de células viáveis no ensaio subestimando o resultado de estrogenicidade ou ocasionando falso-negativo	Diluição da amostra, otimização do preparo da amostra
Contaminação por outros organismos	Contaminação do ensaio	Cuidados no manuseio da estirpe e no preparo das soluções do meio que devem ser estéreis, observação da limpidez das soluções previamente a realização do ensaio, uso de material estéril, uso de fluxo laminar ou cabine de segurança biológica, lacração da placa de ensaio com fita crepe para a incubação
Fase dissolvida e particulada	Não conhecimento da atividade estrogênica total da amostra	Análise de ambas as fases
Compostos antiestrogênicos	Falso-negativo	Análise de antiestrogenicidade

## CONCLUSÃO

Com a avaliação dos fatores interferentes na análise da estrogenicidade de amostras ambientais, misturas químicas e compostos orgânicos, um protocolo otimizado do ensaio YES foi elaborado garantindo a obtenção de sucesso na realização do ensaio com resultados seguros e confiáveis.

Fatores como densidade celular inicial e tempo de incubação do ensaio influenciaram diretamente na sensibilidade do ensaio YES. Valores de EQ-E2 e PR foram comparáveis independentemente da densidade celular adotada e do comprimento de onda utilizado.

Não obstante, valores de CE50 foram dependentes da densidade celular inicial, do tempo de incubação e do veículo da substância de referência (solvente ou água ultrapura) do ensaio. A utilização da carta controle para a substância de referência permitiu a determinação de limites de controle estatístico, monitoramento da média da CE50 e sua dispersão, conferindo mais confiabilidade aos resultados de compostos orgânicos, misturas e amostras ambientais.

O aumento da densidade inicial de células proporcionou maior sensibilidade ao ensaio, sendo adequado para a detecção de atividade estrogênica de amostras com menor concentração de xenoestrogênios. A diminuição do tempo de incubação do ensaio para 48 horas foi adequada para amostras com maior concentração de desreguladores endócrinos estrogênicos.

Dentre os compostos orgânicos estudados, os estrogênios foram os que apresentaram maiores potências estrogênicas. Tal fato explica porque esses compostos costumam ser responsáveis pela maior parte da atividade estrogênica que atinge as águas superficiais.

O BPA foi o composto que apresentou menor potência, atingindo  $7,31 \times 10^{-4}$  de potência relativa. Desse modo, a concentração de BPA precisa ser maior que 10000 vezes a concentração de E2 para apresentar o mesmo efeito estrogênico.

Os parabenos apresentaram citotoxicidade no ensaio YES, mas esta não mascarou o resultado do potencial estrogênico desses compostos, comprovando que sua estrogenicidade pode ser detectada pelo ensaio YES.

As concentrações de atrazina, simazina, triclosan e cafeína estudadas não induziram uma resposta estrogênica através do mecanismo de ação do ensaio YES, tampouco

apresentaram toxicidade. O composto fulvestrant, apesar de ser um antagonista puro, apresentou uma resposta puramente agonista no ensaio YES, comprovando que o organismo utilizado no ensaio não apresenta a capacidade de identificação de todos os compostos antagonistas e, desse modo, alguns compostos antagonistas podem apresentar efeito agonista (estrogênico) quando presentes em amostras ambientais.

Os valores EQ-E2 observados das misturas binárias E2+EE2, E2 +E1 e EE2 +E1 nas concentrações de 5,32 a 10,64 ng L<sup>-1</sup> para E2 e EE2, e de 14,64 a 29,29 ng L<sup>-1</sup> para E1 foram estatisticamente maiores (valor p <0,05) do que os valores de EQ-E2 estimados. Assim, para o mecanismo de ação do ensaio YES, esses compostos apresentaram um efeito maior do que o aditivo nas concentrações testadas, mostrando a necessidade de legislações ambientais que contemplem o estabelecimento de uma concentração limite de atividade estrogênica em vez de concentrações individuais dos compostos.

Os valores de EQ-E2 encontrados nas matrizes ambientais estudadas nessa pesquisa foram: i) água potável: < LD - 3.5 ng L<sup>-1</sup>; ii) água superficial: < LD - 82.9 ng L<sup>-1</sup>; iii) material particulado da água superficial: 15.5 - 34.5 ng L<sup>-1</sup>; iv) afluentes de ETE: < LD - 10.6 ng L<sup>-1</sup>; v) efluente de ETE: < LD - 10.6 ng L<sup>-1</sup>; vi) lixiviado bruto de aterro sanitário: < LD - 794.3 ng L<sup>-1</sup>; vii) material particulado do lixiviado bruto de aterro sanitário: 163 - 1077 ng L<sup>-1</sup>; viii) lixiviado tratado de aterro sanitário: 120.3 ng L<sup>-1</sup>; xi) sedimento: < LD - 11.9 ng g<sup>-1</sup>. No entanto, esses valores de atividade estrogênica podem ser ainda maiores, visto que amostras de água superficial e de lixiviado também apresentaram atividade antiestrogênica, a qual reduziu, ou até mesmo, suprimiu a atividade estrogênica das amostras. E, portanto, a análise de antiestrogenicidade não deve ser descartada na avaliação de uma amostra ambiental, pois compostos antagonistas podem mascarar o resultado da atividade estrogênica da amostra.

Por fim, com todos os testes realizados e os resultados adquiridos foi elaborado um protocolo otimizado do ensaio YES e uma lista de recomendações para a sua implementação e execução. O cumprimento de tal protocolo e a atenção às recomendações elaboradas proporcionou resultados seguros de atividade estrogênica. Dentre as recomendações, destacam-se: (i) a padronização da densidade celular inicial a ser usada no ensaio, pois o uso indiscriminado da densidade celular pode acarretar variações de CE50 e dos limites de detecção e quantificação do ensaio; (ii) o tempo de incubação do ensaio adequado a amostra a ser analisada, pois a redução do tempo de incubação pode levar a diminuição da sensibilidade do método; (iii) a análise da citotoxicidade da amostra e a sua redução ou eliminação quando

possível, pois algumas amostras podem ocasionar uma redução de células viáveis no ensaio subestimando o resultado de estrogenicidade ou ocasionando um falso-negativo como resposta. Ademais recomenda-se sempre reportar a fase (dissolvida ou sólidos suspensos) da amostra que foi analisada e se foi, ou não investigada a atividade antiestrogênica da amostra.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Aplicação de modelos matemáticos, como por exemplo, MIXTOX para prever o efeito de misturas pelo ensaio YES.
- Investigar o crescimento da levedura na presença de lixiviados de aterros sanitários, pois é uma matriz ambiental com elevado caráter tóxico e não ocasionou toxicidade às células de leveduras nesta pesquisa.
- Estudar o efeito em bioequivalência da atividade antiestrogênica pelo ensaio YES.
- Investigar a tolerância da levedura à salinidade.
- Elaborar carta controle com substância de referência em solução aquosa.

## REFERÊNCIAS

- Altenburger, R., Ait-Aissa, S., Antczak, P., Backhaus, T., Barceló, D., Seiler, T.B., Brion, F., Busch, W., Chipman, K., de Alda, M.L., de Aragão Umbuzeiro, G., Escher, B.I., Falciani, F., Faust, M., Focks, A., Hilscherova, K., Hollender, J., Hollert, H., Jäger, F., Jahnke, A., Kortenkamp, A., Krauss, M., Lemkine, G.F., Munthe, J., Neumann, S., Schymanski, E.L., Scrimshaw, M., Segner, H., Slobodnik, J., Smedes, F., Kughathas, S., Teodorovic, I., Tindall, A.J., Tollefsen, K.E., Walz, K.H., Williams, T.D., Van den Brink, P.J., van Gils, J., Vrana, B., Zhang, X., Brack, W., 2015. Future water quality monitoring - Adapting tools to deal with mixtures of pollutants in water resource management. *Sci. Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.057>
- Andò, S., De Amicis, F., Rago, V., Carpino, A., Maggiolini, M., Panno, M.L., Lanzino, M., 2002. Breast cancer: From estrogen to androgen receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 193, 121–128. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(02\)00105-3](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00105-3)
- Aquino, S. De, 2013. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. *Eng Sanit ...* 187–204. <https://doi.org/10.1590/S1413-41522013000300002>
- Argolo, S., Gomes, G., Bila, D.M., 2021. Ecotoxicology and Environmental Safety Insights into total estrogenic activity in a sewage-impacted urban stream assessed via ER transcriptional activation assay : Distribution between particulate and dissolved phases. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 208, 111574. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111574>
- Balsiger, H.A., De, R., Lee, W., Cox, M.B., 2010. Science of the Total Environment A four-hour yeast bioassay for the direct measure of estrogenic activity in wastewater without sample extraction , concentration , or sterilization. *Sci. Total Environ.* 408, 1422–1429. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.12.027>
- Beck, I.-C., Bruhn, R., Gandrass, J., 2006. Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen. *Chemosphere* 63, 1870–1878. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.10.022>
- Beresford, N, Routledge, E.J., Harris, C. a, Sumpter, J.P., 2000. Issues arising when interpreting results from an in vitro assay for estrogenic activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 162, 22–33. <https://doi.org/10.1006/taap.1999.8817>
- Bergman, Å., Heindel, J., Jobling, S., Kidd, K., Zoeller, R.T., 2012. State of the science of endocrine disrupting chemicals, 2012, *Toxicology Letters.* <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.03.020>
- Bila, D.M., Dezotti, M., 2007. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e conseqüências. *Quim. Nova* 30, 651–666. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000300027>
- Birkett, J. w., Lester, J.N., 2003. Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes. *J. Hazard. Mater.* 100, 317–318.

3894(03)00103-1

- Brack, W., Ait-Aissa, S., Burgess, R.M., Busch, W., Creusot, N., Di Paolo, C., Escher, B.I., Mark Hewitt, L., Hilscherova, K., Hollender, J., Hollert, H., Jonker, W., Kool, J., Lamoree, M., Muschket, M., Neumann, S., Rostkowski, P., Ruttkies, C., Schollee, J., Schymanski, E.L., Schulze, T., Seiler, T.B., Tindall, A.J., De Aragão Umbuzeiro, G., Vrana, B., Krauss, M., 2016. Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic environments - An in-depth overview. *Sci. Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.102>
- BRASIL, Ministério da Saúde, Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017: Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. *Diário Oficial da União*, 28/09/2017; Brasília, DF.
- Brehm, E., Flaws, J.A., 2019. Transgenerational effects of endocrine-disrupting chemicals on Male and female reproduction. *Endocrinology* 160, 1421–1435. <https://doi.org/10.1210/en.2019-00034>
- Breithofer, A., Graumann, K., Scicchitano, M.S., Karathanasis, S.K., Butt, T.R., Jungbauer, A., 1998. Regulation of human estrogen receptor by phytoestrogens in yeast and human cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 67, 421–429. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(98\)00139-3](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(98)00139-3)
- Brix, R., Noguerol, T.N., Piña, B., Balaam, J., Nilsen, A.J., Tollefsen, K.E., Levy, W., Schramm, K.W., Barceló, D., 2010. Evaluation of the suitability of recombinant yeast-based estrogenicity assays as a pre-screening tool in environmental samples. *Environ. Int.* 36, 361–367. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.02.004>
- Chaves, F.P., Gomes, G., Della-flora, A., Dallegrave, A., Sirtori, C., Saggiaro, E.M., Bila, D.M., 2020. Science of the Total Environment Comparative endocrine disrupting compound removal from real wastewater by UV / Cl and UV / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Effect of pH, estrogenic activity, transformation products and toxicity. *Sci. Total Environ.* 746, 141041. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141041>
- Cheskis, B.J., Greger, J.G., Nagpal, S., Freedman, L.P., 2007. Signaling by estrogens. *J. Cell. Physiol.* 213, 610–617. <https://doi.org/10.1002/jcp.21253>
- Chia, V.M., Li, Y., Quraishi, S.M., Graubard, B.I., Figueroa, J.D., Weber, J.P., Chanock, S.J., Rubertone, M. V., Erickson, R.L., McGlynn, K.A., 2010. Effect modification of endocrine disruptors and testicular germ cell tumour risk by hormone-metabolizing genes. *Int. J. Androl.* 33, 588–596. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.00975.x>
- Citulski, J., Farahbakhsh, K., 2012. Overcoming the toxicity effects of municipal wastewater sludge and biosolid extracts in the Yeast Estrogen Screen (YES) assay. *Chemosphere* 87, 498–503. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.043>
- Cole, T.J., Short, K.L., Hooper, S.B., 2019. Seminars in Fetal and Neonatal Medicine The science of steroids. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 24, 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2019.05.005>
- COMISSÃO EUROPEIA. Decisão de Execução da Comissão, de 18 de janeiro de 2013, que isenta a prospeção de petróleo e de gás em Chipre da aplicação da Diretiva 2004/17/CE

do Parlamento Europeu e do Conselho, relativa à coordenação dos processos de adjudicação de contratos nos setores da água, da energia, dos transportes e dos serviços postais [notificada com o número C(2013) 60] Texto relevante para efeitos do EEE. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 348, 24/12/2008, p. 235–248; Bruxelas.

COMISSÃO EUROPEIA. Decisão de Execução (UE) 2015/495 da Comissão, de 20 de março de 2015, que estabelece uma lista de vigilância das substâncias para monitorização a nível da União no domínio da política da água nos termos da Diretiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho. *Jornal Oficial da União Europeia* [notificada com o número C(2015) 1756]. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 78, 24/03/2015, p. 40–42; Bruxelas.

COMISSÃO EUROPEIA. Decisão de Execução (UE) 2018/840 da Comissão, de 5 de junho de 2018, que estabelece uma lista de vigilância das substâncias a monitorizar a nível da União no domínio da política da água, nos termos da Diretiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, e que revoga a Decisão de Execução (UE) 2015/495 da Comissão [notificada com o número C(2018) 3362]. *Jornal Oficial da União Europeia*.

CONAMA, Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA: Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, 18/03/2005; Brasília, DF.

CONAMA, Resolução nº 396, de 3 de abril de 2008 do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA: Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, 07/04/2008; Brasília, DF.

CONAMA, Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011 do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA: Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. *Diário Oficial da União*, 16/05/2011; Brasília, DF.

Conley, J.M., Evans, N., Mash, H., Rosenblum, L., Schenck, K., Glassmeyer, S., Furlong, E.T., Kolpin, D.W., Wilson, V.S., 2017. Comparison of in vitro estrogenic activity and estrogen concentrations in source and treated waters from 25 U.S. drinking water treatment plants. *Sci. Total Environ.* 579, 1610–1617. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.093>

Crain, D.A., Janssen, S.J., Edwards, T.M., Heindel, J., Ho, S. mei, Hunt, P., Iguchi, T., Juul, A., McLachlan, J.A., Schwartz, J., Skakkebaek, N., Soto, A.M., Swan, S., Walker, C., Woodruff, T.K., Woodruff, T.J., Giudice, L.C., Guillette, L.J., 2008. Female reproductive disorders: the roles of endocrine-disrupting compounds and developmental timing. *Fertil. Steril.* 90, 911–940. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.08.067>

Darbre, P.D., 2015. *Disruptors of Estrogen Action and Synthesis, Endocrine Disruption and Human Health*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801139-3.00003-X>

Di Paolo, C., Ottermanns, R., Keiter, S., Ait-Aissa, S., Bluhm, K., Brack, W., Breitholtz, M., Buchinger, S., Carere, M., Chalon, C., Cousin, X., Dulio, V., Escher, B.I., Hamers, T., Hilscherová, K., Jarque, S., Jonas, A., Maillot-Marechal, E., Marneffe, Y., Nguyen, M.T.,

- Pandard, P., Schifferli, A., Schulze, T., Seidensticker, S., Seiler, T.B., Tang, J., van der Oost, R., Vermeirssen, E., Zounková, R., Zwart, N., Hollert, H., 2016. Bioassay battery interlaboratory investigation of emerging contaminants in spiked water extracts – Towards the implementation of bioanalytical monitoring tools in water quality assessment and monitoring. *Water Res.* <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.08.018>
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T., Gore, A.C., 2009. Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement. *Endocr. Rev.* 30, 293–342. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0002>
- Dias, A.C.V., Gomes, F.W., Bila, D.M., Sant’Anna, G.L., Dezotti, M., 2015. Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 120, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.013>
- Diel, P., Smolnikar, K., Michna, H., 1999. In vitro test systems for the evaluation of the estrogenic activity of natural products. *Planta Med.* 65, 197–203. <https://doi.org/10.1055/s-1999-13980>
- Folmar, L.C., Denslow, N.D., Rao, V., Chow, M., Crain, D.A., Enblom, J., Marcino, J., Guillette, L.J., 1996. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ. Health Perspect.* 104, 1096–1101. <https://doi.org/10.1289/ehp.961041096>
- Folmar, L.C., Hemmer, M., Hemmer, R., Bowman, C., Kroll, K., 2000. Comparative estrogenicity of estradiol, ethynyl estradiol and diethylstilbestrol in an in vivo, male sheepshead minnow (*Cyprinodon 6 ariegatus*), vitellogenin bioassay. *Aquat. Toxicol.* 49, 77–88.
- Folmar, L.C., Hemmer, M.J., Denslow, N.D., Kroll, K., Chen, J., Cheek, A., Richman, H., Meredith, H., Grau, E.G., 2002. A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor in vivo and in vitro. *Aquat. Toxicol.* 60, 101–110. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(01\)00276-4](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00276-4)
- Frische, T., Faust, M., Meyer, W., Backhaus, T., 2009. Toxic masking and synergistic modulation of the estrogenic activity of chemical mixtures in a yeast estrogen screen (YES). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16, 593–603. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0184-7>
- Gaido, K.W., Leonard, L.S., Lovell, S., Gould, J.C., Babaï, D., Portier, C.J., McDonnell, D.P., 1997. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 143, 205–212. <https://doi.org/S0041008X96980692> [pii]
- Gehrmann, L., Bielak, H., Behr, M., Itzel, F., Lyko, S., Simon, A., Kunze, G., Dopp, E., Wagner, M., Tuerk, J., 2016. (Anti-)estrogenic and (anti-)androgenic effects in wastewater during advanced treatment: comparison of three in vitro bioassays. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 4094–4104. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7165-4>
- Hamers, T., Legler, J., Blaha, L., Hylland, K., Marigomez, I., Schipper, C.A., Segner, H.,

- Vethaak, A.D., Witters, H., de Zwart, D., Leonards, P.E.G., 2013. Expert opinion on toxicity profiling-report from a NORMAN expert group meeting. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 9, 185–191. <https://doi.org/10.1002/ieam.1395>
- Hecker, M., Hollert, H., 2011. Endocrine disruptor screening: Regulatory perspectives and needs. *Environ. Sci. Eur.* 23, 1–14. <https://doi.org/10.1186/2190-4715-23-15>
- Hettwer, K., Jähne, M., Frost, K., Giersberg, M., Kunze, G., Trimborn, M., Reif, M., Türk, J., Gehrman, L., Dardenne, F., De Croock, F., Abraham, M., Schoop, A., Waniek, J.J., Bucher, T., Simon, E., Vermeirssen, E., Werner, A., Hellauer, K., Wallentits, U., Drewes, J.E., Dietzmann, D., Routledge, E., Beresford, N., Zietek, T., Siebler, M., Simon, A., Bielak, H., Hollert, H., Müller, Y., Harff, M., Schiwy, S., Simon, K., Uhlig, S., 2018. Validation of *Arxula* Yeast Estrogen Screen assay for detection of estrogenic activity in water samples: Results of an international interlaboratory study. *Sci. Total Environ.* 621, 612–625. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.211>
- Huggett, D.B., Foran, C.M., Brooks, B.W., Weston, J., Peterson, B., Marsh, K.E., La Point, T.W., Schlenk, D., 2003. Comparison of in vitro and in vivo bioassays for estrogenicity in effluent from North American municipal wastewater facilities. *Toxicol. Sci.* 72, 77–83. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg017>
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 19040-1: Water quality — Determination of the estrogenic potential of water and waste water — Part 1: Yeast estrogen screen (*Saccharomyces cerevisiae*). Geneva, 2018.
- Jardim, W.F., Montagner, C.C., Pescara, I.C., Umbuzeiro, G. a., Di Dea Bergamasco, A.M., Eldridge, M.L., Sodr , F.F., 2012. An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water. *Sep. Purif. Technol.* 84, 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.06.020>
- Jarošová, B., Bláha, L., Giesy, J.P., Hilscherová, K., 2014. What level of estrogenic activity determined by in vitro assays in municipal waste waters can be considered as safe? *Environ. Int.* 64, 98–109. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.12.009>
- Jobling S., Nolan M., Tyler C.R., Brighty G., S.J.P., 1998. Widespread Sexual Disruption in. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2498–2506.
- Jobling, S., Coey, S., Whitmore, J.G., Kime, D.E., Van Look, K.J.W., McAllister, B.G., Beresford, N., Henshaw, A.C., Brighty, G., Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 2002. Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility. *Biol. Reprod.* 67, 515–524. <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.2.515>
- Kamata, R., Shiraishi, F., Nakajima, D., Kageyama, S., 2011. Estrogenic effects of leachates from industrial waste landfills measured by a recombinant yeast assay and transcriptional analysis in Japanese medaka. *Aquat. Toxicol.* 101, 430–437. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.11.018>
- Jonker, M.J., Svendsen, C., Bedaux, J.J.M., Bongers, M., Kammenga, J.E 2005. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2701–2713.

- Karthikraj, R., Vasu, A.K., Balakrishna, K., Sinha, R.K., Kannan, K., 2017. Occurrence and fate of parabens and their metabolites in five sewage treatment plants in India. *Sci. Total Environ.* 593–594, 592–598. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.173>
- Kawagoshi, Y., Fujita, Y., Kishi, I., Fukunaga, I., 2003. Estrogenic chemicals and estrogenic activity in leachate from municipal waste landfill determined by yeast two-hybrid assay. *J. Environ. Monit.* 5, 269–274. <https://doi.org/10.1039/b210962j>
- Khetan, S. K. *Endocrine Disruptors in the Environment*, Wiley, 2014. 376p
- Kolle, S.N., Kamp, H.G., Huener, H.A., Knickel, J., Verlohner, A., Woitkowiak, C., Landsiedel, R., van Ravenzwaay, B., 2010. In house validation of recombinant yeast estrogen and androgen receptor agonist and antagonist screening assays. *Toxicol. Vitro.* 24, 2030–2040. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.08.008>
- Kortenkamp, A., 2014. Low dose mixture effects of endocrine disrupters and their implications for regulatory thresholds in chemical risk assessment. *Curr. Opin. Pharmacol.* 19, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.08.006>
- Kunz, P.Y., Kienle, C., Carere, M., Homazava, N., Kase, R., 2015. In vitro bioassays to screen for endocrine active pharmaceuticals in surface and waste waters. *J. Pharm. Biomed. Anal.* <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.11.018>
- Legler, J., Dennekamp, M., Vethaak, A.D., Brouwer, A., Koeman, J.H., van der Burg, B., Murk, A.J., 2002. Detection of estrogenic activity in sediment-associated compounds using in vitro reporter gene assays. *Sci. Total Environ.* 293, 69–83. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)01146-9](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)01146-9)
- Leusch, F.D.L., Neale, P.A., Arnal, C., Aneck-Hahn, N.H., Balaguer, P., Bruchet, A., Escher, B.I., Esperanza, M., Grimaldi, M., Leroy, G., Scheurer, M., Schlichting, R., Schriks, M., Hebert, A., 2018. Analysis of endocrine activity in drinking water, surface water and treated wastewater from six countries. *Water Res.* 139, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.056>
- Leusch, F.D.L., Neale, P.A., Hebert, A., Scheurer, M., Schriks, M.C.M., 2017. Analysis of the sensitivity of in vitro bioassays for androgenic, progestagenic, glucocorticoid, thyroid and estrogenic activity: Suitability for drinking and environmental waters. *Environ. Int.* 99, 120–130. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.12.014>
- Li, B., Cao, J., Xing, C., Wang, Z., Cui, L., 2015. Assessing estrogenic activity and reproductive toxicity of organic extracts in WWTP effluents. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39, 942–952. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.07.018>
- Li, D.K., Zhou, Z., Miao, M., He, Y., Wang, J., Ferber, J., Herrinton, L.J., Gao, E., Yuan, W., 2011. Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. *Fertil. Steril.* 95, 625–630.e4. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.09.026>
- Lorenzen, A., Hendel, J.G., Conn, K.L., Bittman, S., Kwabiah, A.B., Lazarovitz, G., Massé, D., McAllister, T. a., Topp, E., 2004. Survey of hormone activities in municipal biosolids and animal manures. *Environ. Toxicol.* 19, 216–225. <https://doi.org/10.1002/tox.20014>

- Loureiro, S., Amorim, M.J.B., Campos, B., Rodrigues, S.M.G., Soares, A.M.V.M., 2009. Assessing joint toxicity of chemicals in *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae) and *Porcellionides pruinosus* (Isopoda) using avoidance behaviour as an endpoint. *Environ. Pollut.* 157, 625–636. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.08.010>
- Lourenço, S.O. *Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações*. São Carlos: RiMa, 2006. 606 p
- Luo, H., Zeng, Y., Cheng, Y., He, D., Pan, X., 2020. Recent advances in municipal landfill leachate: A review focusing on its characteristics, treatment, and toxicity assessment. *Sci. Total Environ.* 703, 135468. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135468>
- Ma, L., Yates, S.R., 2018. Dissolved organic matter and estrogen interactions regulate estrogen removal in the aqueous environment: A review. *Sci. Total Environ.* 640–641, 529–542. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.301>
- Metcalf, C.D., Kleywegt, S., Letcher, R.J., Topp, E., Wagh, P., Trudeau, V.L., Moon, T.W., 2013. A multi-assay screening approach for assessment of endocrine-active contaminants in wastewater effluent samples. *Sci. Total Environ.* 454–455, 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.074>
- Murk, A.J., Legler, J., van Lipzig, M.M.H., Meerman, J.H.N., Belfroid, A.C., Spenkeliink, A., van der Burg, B., Rijs, G.B.J., Vethaak, D., 2002. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 16–23.
- Nash, J.P., Kime, D.E., Van der Ven, L.T.M., Wester, P.W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P., Tyler, C.R., 2004. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environ. Health Perspect.* 112, 1725–1733. <https://doi.org/10.1289/ehp.7209>
- Neale, P.A., Escher, B.I., Leusch, F.D.L., 2015. Understanding the implications of dissolved organic carbon when assessing antagonism in vitro: An example with an estrogen receptor assay. *Chemosphere* 135, 341–346. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.084>
- Newbold, R.R., 2010. Impact of environmental endocrine disrupting chemicals on the development of obesity. *Hormones* 9, 206–217. <https://doi.org/10.14310/horm.2002.1271>
- Nishikawa, J.I., Saito, K., Goto, J., Dakeyama, F., Matsuo, M., Nishihara, T., 1999. New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 154, 76–83. <https://doi.org/10.1006/taap.1998.8557>
- Norman, A.W., Mizwicki, M.T., Norman, D.P.G., 2004. STEROID-HORMONE RAPID ACTIONS, MEMBRANE RECEPTORS AND A CONFORMATIONAL ENSEMBLE MODEL. <https://doi.org/10.1038/nrd1283>
- PARLAMENTO EUROPEU. Directiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Outubro de 2000, que estabelece um quadro de acção comunitária no domínio da política da água. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 327, 22/02/2000, p. 1–73; Bruxelas.

- PARLAMENTO EUROPEU. Directiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de Dezembro de 2008, relativa a normas de qualidade ambiental no domínio da política da água, que altera e subsequentemente revoga as Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE e 86/280/CEE do Conselho, e que altera a Directiva 2000/60/CE. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 348, 24/12/2008, p. 235–248; Bruxelas.
- Parrella, A., Lavorgna, M., Criscuolo, E., Russo, C., Isidori, M., 2014. Estrogenic activity and cytotoxicity of six anticancer drugs detected in water systems. *Sci. Total Environ.* 485–486, 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.050>
- Pawlowski, S., Ternes, T. a., Bonerz, M., Rastall, a. C., Erdinger, L., Braunbeck, T., 2004. Estrogenicity of solid phase-extracted water samples from two municipal sewage treatment plant effluents and river Rhine water using the yeast estrogen screen. *Toxicol. Vitr.* 18, 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2003.08.006>
- Pereira, C. P., da Conceição Pereira, T., Gomes, G., Quintaes, B.R., Bila, D.M., Campos, J.C., 2018. Evaluation of reduction estrogenic activity in the combined treatment of landfill leachate and sanitary sewage. *Waste Manag.* 80, 339–348. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.09.018>
- Purvisa, I.J., Dykes, C.W., Lubahn, D.B., French, F.S., Wilson, E.M., 1991. An androgen-inducible 106, 35–42.
- Rajapakse, N., Ong, D., Kortenkamp, A., 2001. Defining the impact of weakly estrogenic chemicals on the action of steroidal estrogens. *Toxicol. Sci.* 60, 296–304. <https://doi.org/10.1093/toxsci/60.2.296>
- Ramirez, T., Buechse, A., Dammann, M., Melching-Kollmuß, S., Woitkowiak, C., van Ravenzwaay, B., 2014. Effect of estrogenic binary mixtures in the yeast estrogen screen (YES). *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 70, 286–296. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.07.006>
- Routledge, E.J., Sumpter, J.P., 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 241–248. [https://doi.org/10.1897/1551-5028\(1996\)015<0241:EAOSAS>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(1996)015<0241:EAOSAS>2.3.CO;2)
- Roy, J.R., Chakraborty, S., Chakraborty, T.R., 2009. Estrogen-like endocrine disrupting chemicals affecting puberty in humans - A review. *Med. Sci. Monit.* 15, 137–145.
- Ruan, T., Liang, D., Song, S., Song, M., Wang, H., Jiang, G., 2015. Evaluation of the in vitro estrogenicity of emerging bisphenol analogs and their respective estrogenic contributions in municipal sewage sludge in China. *Chemosphere* 124, 150–5. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.12.017>
- Rutishauser, B. V, Pesonen, M., Escher, B.I., Ackermann, G.E., Aerni, H.-R., Suter, M.J.F., Eggen, R.I.L., 2004. Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three in vitro assays and chemical analysis of steroids. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 857–864. <https://doi.org/10.1897/03-286>
- Saito, M., Tanaka, H., Takahashi, A., Yakou, Y., 2002. Comparison of yeast-based estrogen

- receptor assays. *Water Sci. Technol.* 46, 349–354. <https://doi.org/10.2166/wst.2002.0761>
- Scholze, M., Silva, E., Kortenkamp, A., 2014. Extending the applicability of the dose addition model to the assessment of chemical mixtures of partial agonists by using a novel toxic unit extrapolation method. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088808>
- Schultis, T., Metzger, J.W., 2004. Determination of estrogenic activity by LYES-assay (yeast estrogen screen-assay assisted by enzymatic digestion with lyticase). *Chemosphere* 57, 1649–1655. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.06.027>
- Schwartz, N., Verma, A., Bivens, C.B., Schwartz, Z., Boyan, B.D., 2016. Biochimica et Biophysica Acta Rapid steroid hormone actions via membrane receptors. *BBA - Mol. Cell Res.* 1863, 2289–2298. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.06.004>
- Silva, E., Rajapakse, N., Kortenkamp, A., 2002. Something from “nothing” - Eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1751–1756. <https://doi.org/10.1021/es0101227>
- Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Mariana, F., Olea, N., Serrano, F.O., 1995. The E-SCREEN Assay as a Tool to Identify Estrogens : An Update on Estrogenic Environmental Pollutants. *Environ. Health Perspect.* 103, 113–122.
- Sumpter, J.P., Johnson, A.C., 2008. 10th Anniversary Perspective: Reflections on endocrine disruption in the aquatic environment: From known knowns to unknown unknowns (and many things in between). *J. Environ. Monit.* 10, 1476–1485. <https://doi.org/10.1039/b815741n>
- Thayer, K.A., Heindel, J.J., Bucher, J.R., Gallo, M.A., 2012. EnVC obesity and diabetes from NTP 120, 779–790.
- Tousova, Z., Oswald, P., Slobodnik, J., Blaha, L., Muz, M., Hu, M., Brack, W., Krauss, M., Di Paolo, C., Tarcai, Z., Seiler, T.B., Hollert, H., Koprivica, S., Ahel, M., Schollée, J.E., Hollender, J., Suter, M.J.F., Hidasi, A.O., Schirmer, K., Sonavane, M., Ait-Aissa, S., Creusot, N., Brion, F., Froment, J., Almeida, A.C., Thomas, K., Tollefsen, K.E., Tufi, S., Ouyang, X., Leonards, P., Lamoree, M., Torrens, V.O., Kolkman, A., Schriks, M., Spirhanzlova, P., Tindall, A., Schulze, T., 2017. European demonstration program on the effect-based and chemical identification and monitoring of organic pollutants in European surface waters. *Sci. Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.032>
- Vega-Morales, T., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J.J., 2013. Evaluation of the presence of endocrine-disrupting compounds in dissolved and solid wastewater treatment plant samples of Gran Canaria Island (Spain). *Biomed Res. Int.* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/790570>
- Vertino, A.M., Bula, C.M., Chen, J.R., Almeida, M., Han, L., Bellido, T., Kousteni, S., Norman, A.W., Manolagas, S.C., 2005. Nongenotropic, anti-apoptotic signaling of  $1\alpha,25(\text{OH})_2$  vitamin D<sub>3</sub> and analogs through the ligand binding domain of the vitamin D receptor in osteoblasts and osteocytes: Mediation by Src, phosphatidylinositol 3-, and JNK kinases. *J. Biol. Chem.* 280, 14130–14137. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410720200>
- Viganò, L., Benfenati, E., Cauwenberge, A. Van, Eidem, J.K., Erratico, C., Goksøyr, A., Kloas,

- W., Maggioni, S., Mandich, A., Urbatzka, R., 2008. Estrogenicity profile and estrogenic compounds determined in river sediments by chemical analysis, ELISA and yeast assays. *Chemosphere* 73, 1078–1089. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.057>
- Vrtačnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrač, S., Marc, J., 2014. The many faces of estrogen signaling. *Biochem. Medica* 24, 329–342. <https://doi.org/10.11613/BM.2014.035>
- Wagner, M., Vermeirssen, E.L.M., Buchinger, S., Behr, M., Magdeburg, A., Oehlmann, J., 2013. Deriving bio-equivalents from in vitro bioassays: Assessment of existing uncertainties and strategies to improve accuracy and reporting. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 1906–1917. <https://doi.org/10.1002/etc.2256>
- Wenzel, A., Müller, J., Ternes, T., 2003. Study on endocrine disrupters in drinking water 1–152.
- Wernersson, A.S., Carere, M., Maggi, C., Tusil, P., Soldan, P., James, A., Sanchez, W., Dulio, V., Broeg, K., Reifferscheid, G., Buchinger, S., Maas, H., Van Der Grinten, E., O’Toole, S., Ausili, A., Manfra, L., Marziali, L., Polesello, S., Lacchetti, I., Mancini, L., Lilja, K., Linderoth, M., Lundeborg, T., Fjällborg, B., Porsbring, T., Larsson, D.G.J., Bengtsson-Palme, J., Förlin, L., Kienle, C., Kunz, P., Vermeirssen, E., Werner, I., Robinson, C.D., Lyons, B., Katsiadaki, I., Whalley, C., den Haan, K., Messiaen, M., Clayton, H., Lettieri, T., Carvalho, R.N., Gawlik, B.M., Hollert, H., Di Paolo, C., Brack, W., Kammann, U., Kase, R., 2015. The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. *Environ. Sci. Eur.* 27, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12302-015-0039-4>
- WHO (World Health Organization), 2012. Possible developmental early effects of endocrine disrupters on child health 1–84.
- Wieczerek, M., Kudlak, B., Yotova, G., Nedyalkova, M., Tsakovski, S., Simeonov, V., Namieśnik, J., 2016. Modeling of pharmaceuticals mixtures toxicity with deviation ratio and best-fit functions models. *Sci. Total Environ.* 571, 259–268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.186>
- Xiao, S., Lv, X., Lu, Y., Yang, X., Dong, X., Ma, K., Zeng, Y., Jin, T., Tang, F., 2016. Occurrence and change of estrogenic activity in the process of drinking water treatment and distribution. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 16977–16986. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6866-z>
- Yang, R., Li, N., Rao, K., Ma, M., Wang, Z., 2015. Combined action of estrogen receptor agonists and antagonists in two-hybrid recombinant yeast in vitro. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 111, 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.025>
- Yarahmadi, H., Duy, S.V., Hachad, M., Dorner, S., Sauvé, S., Prévost, M., 2018. Seasonal variations of steroid hormones released by wastewater treatment plants to river water and sediments: Distribution between particulate and dissolved phases. *Sci. Total Environ.* 635, 144–155. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.370>
- Yu, H., Caldwell, D.J., Suri, R.P., 2019. In vitro estrogenic activity of representative endocrine disrupting chemicals mixtures at environmentally relevant concentrations. *Chemosphere* 215, 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.067>

- Zacharewski, T.R., Berhane, K., Gillesby, B.E., Kent Burnison, B., 1995. Detection of Estrogen- and Dioxin-like Activity in Pulp and Paper Mill Black Liquor and Effluent Using in Vitro Recombinant Receptor/Reporter Gene Assays. *Environ. Sci. Technol.* 29, 2140–2146. <https://doi.org/10.1021/es00008a037>
- Zagatto, P. A.; Bertoletti, E. *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*. 2. ed. São Paulo: Rima, 2008. 472 p.
- Zeng, Q., Cao, W.-C., Xu, L., Chen, Y.-Z., Yun, L.-J., Liu, A.-L., Zhang, J., Lu, W.-Q., 2013. Spatial and temporal evaluations of estrogenic activity in tap water served by a water plant in Wuhan, China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 91, 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.02.003>

## APÊNDICE 1 – Publicações do grupo de pesquisa

O estudo dos fatores que interferem no ensaio in vitro YES propiciaram a publicação de vários artigos do grupo de pesquisa, podemos destacar 5 artigos publicados (4 A1 e 1 B1 na classificação de 2016 do qualis das Engenharias I) e 1 artigo submetido à Chemosphere, que também é classificada como A1. Os artigos publicados abrangem os resultados dos experimentos com as modificações que foram realizadas para o ensaio YES nesta tese.

O último artigo submetido é o mais amplo, onde todos os fatores interferentes na avaliação de estrogenicidade de amostras ambientais, misturas químicas e substâncias simples são relatados.

Abaixo segue a lista com a enumeração dos artigos submetidos, aceitos e publicados com os experimentos realizados nesse estudo e sua respectiva contribuição para a elaboração desta tese.

1. Gomes, Giselle; Argolo, Allan dos Santos; Felix, Louise da Cruz; Bila, Daniele Maia. **Assessment of interfering factors in recombinant yeast-based assay towards evaluation of estrogenicity in environmental samples, chemical mixtures and single substances.** CHEMOSPHERE, submetido em 10/11/2020 FI 5;78 A1

Artigo principal da tese, onde todas as modificações e testes realizados com o ensaio YES foram divulgadas. Abrange sobre as densidades celulares do organismo teste usadas no ensaio, o tempo de incubação do ensaio, sensibilidade do método, carta-controle da substância de referência E2, possíveis interferentes e dificuldades na análise de amostras ambientais, limite de detecção de substâncias simples e suas potências relativas, análise dos efeitos observados e estimado de misturas de estrogênios e BPA.

2. Argolo Allan dos Santos; Gomes, Giselle; Bila, Daniele Maia. **Insights into total estrogenic activity in a sewage-impacted urban stream assessed via ER transcriptional activation assay: distribution between particulate and dissolved**

**phases.** ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY, aceito para publicação em 24/11/2020. FI 4,87 A1.

Neste artigo foi elucidado a contribuição dos compostos adsorvidos no material particulado para a atividade estrogênica total da amostra. No começo da implementação do ensaio no LES, somente a fase dissolvida era analisada. Com o avanço do conhecimento do método YES, as análises foram expandidas para o material particulado. Neste artigo constam as primeiras amostras que foram analisadas a fase particulada, permitindo que a mensuração da atividade estrogênica contemplasse também os compostos adsorvidos aos sólidos suspensos.

Com o conhecimento de que era possível a quantificação da estrogenicidade presente no material particulado, elaborou-se a ideia de que parte da atividade estrogênica do lixiviado poderia estar nesta fase, pois a dificuldade de análise inerente a esta matriz é grande e muitas vezes os valores encontrados não pareciam coerentes com a realidade das amostras. Então, mediante a ela apresentar elevada concentração de sólidos suspensos, levantou-se a hipótese de parte da estrogenicidade estar sendo negligenciada ao não avaliar esta fase.

3. Chaves, Fernanda Pereira; Gomes, Giselle; Della-Flora, Alexandre; Dallegrove, Alessandro; Sirtori, Carla; Saggiore, Enrico Mendes; Bila, Daniele Maia. **Comparative endocrine disrupting compound removal from real wastewater by UV/Cl and UV/H2O2: Effect of pH, estrogenic activity, transformation products and toxicity.** SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT, v. 746, p. 141041, 2020. FI 6,55 A1
4. Saggiore, Enrico M.; Chaves, Fernanda P; Felix, Louise C; Gomes, Giselle; Bila, Daniele M. **Endocrine Disruptor Degradation by UV/Chlorine and the Impact of Their Removal on Estrogenic Activity and Toxicity.** INTERNATIONAL JOURNAL OF PHOTOENERGY, v. 2019, p. 1-9, 2019. FI 1,88 B1. Citações:2

Para estes dois artigos foi testado a possibilidade de realização do ensaio YES com a curva padrão em solução aquosa. Além disso, amostras sem a realização de extração em fase sólida foram analisadas. Contribuindo para o conhecimento da possibilidade de o ensaio ser realizado nessas condições, demandando menor tempo de preparo de amostras e não ocorrendo contaminação na placa de ensaio incubada mesmo sem a purificação promovida pela EFS na amostra.

5. do Nascimento, Marilia Teresa Lima; Santos, Ana Dalva de Oliveira; Felix, Louise Cruz; Gomes, Giselle; de Oliveira e Sá, Mariana; da Cunha, Danieli Lima; Vieira, Natividade; Hauser-Davis, Rachel Ann; Baptista Neto, José Antonio; Bila, Daniele Maia. **Determination of water quality, toxicity and estrogenic activity in a nearshore marine environment in Rio de Janeiro, Southeastern Brazil.** ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY, v. 149, p. 197-202, 2018. FI 4,87 A1

Foi a partir da análise dessas amostras ambientais que se estabeleceu a sensibilidade do método, definindo como os limites de detecção e quantificação seriam calculados.

6. Griffero, L; Gomes, G.; Berazategui, M.; Fosalba, C.; Teixeira de Mello, F.; Rezende, C.E.; Bila, D. M.; García-Alonso, J.. **Estrogenicity and cytotoxicity of sediments and water from the drinkwater source-basin of Montevideo city, Uruguay.** ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL CONTAMINATION, v. 13, p. 15-22, 2018.

Com essas amostras de sedimento tomou-se conhecimento do teor de citotoxicidade presente nessa matriz para as células de levedura do ensaio YES. Além disso toda a metodologia de preparo dessa matriz ambiental foi estabelecida.

## APÊNDICE 2 – Protocolo otimizado do ensaio YES obtido na Fase 1

### 1. Materiais, equipamentos e reagentes necessários para o preparo das amostras, das soluções e para a realização do ensaio YES

Para a implementação e execução do ensaio YES os seguintes materiais, equipamentos e reagentes apresentados na Tabela A são necessários.

Tabela A – Materiais, equipamentos e reagentes necessários para o preparo das amostras, das soluções e para a realização do ensaio YES

	<b>Preparo das amostras</b>	<b>Preparo das soluções</b>	<b>Realização do ensaio YES</b>
<b>Materiais</b>	Vidro âmbar 1L	Filtro seringa 0,2 micra	Ponteira e pipeta de 10 a 100 µl
	Balão volumétrico 1L	Seringa descartável	Ponteira e pipeta de 100 a 1000 µl
	Membrana de filtração 0,45 e 0,7 µm	Frasco scotch 1L, 500 mL, 250 mL	Pipeta multicanal 10 a 200 µL
	Cartucho strata x 6 mL	Vido ambar 50 mL	Pipeta sorolológica 5 mL, 10mL e 50mL
	Cartucho strata sax 6 mL	Balão volumérico 1 L, 250 mL, 100 mL, 10 mL	Placa 96 poços transparente
			Tubo falcon 50 mL ou frasco de vidro esterilizado

*Continua*

## Continuação

Tabela A – Materiais, equipamentos e reagentes necessários para o preparo das amostras, das soluções e para a realização do ensaio YES

	<b>Preparo das amostras</b>	<b>Preparo das soluções</b>	<b>Realização do ensaio YES</b>
<b>Materiais</b>	Vial 5 mL	Becker 50 mL  Bastão de vidro Funil de vidro	Frasco para cultivo de células (Frasco T) 50 mL
<b>Equipamentos</b>	Manifold Bomba à vácuo  Fluxo de nitrogênio Capela com sistema de exaustão Sistema Milli-q  Phmetro	Balança Autoclave  Cabine de segurança biológica ou fluxo laminar Sistema Milli-q Freezer e geladeira	Incubadora orbital Cabine de segurança biológica ou fluxo laminar Agitador de placas de 96 poços Estufa Leitora de placas para absorvância em 575 e 620 nm Espectrofotômetro
<b>Reagentes</b>	hexano, acetona, metanol, etanol, água ultrapura, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (fosfato de potássio monobásico), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sulfato de amônio), KOH peletes (hidróxido de potássio), $\text{MgSO}_4$ (sulfato de magnésio), $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (sulfato férrico hidratado), L-leucina, L-histidina, adenina, L-arginina – HCl, L-metionina, L-tirosina, L-isoleucina, L-isoleucina, L-lisina – HCl, L-fenilalanina, L-ácido glutâmico, L-valina, L-serina, glicose, ácido L-aspártico, L-treonina, sulfato de cobre, tiamina, piridoxina, pantetonato de cálcio, myo Inositol, biotina, CPRG, $17\beta$ -estradiol		

## 2. Coleta, transporte e preparo das amostras

### 2.1. Coleta

Todas as amostras devem ser coletadas em frascos de vidro âmbar previamente descontaminados. É recomendada a lavagem dos vidros com detergente neutro Extran®, pois este é um concentrado de tensoativos que quando diluído, atinge um elevado poder de detergência, deixando as vidrarias limpas e sem resíduos. Após a lavagem, todos os utensílios de laboratório devem ser rinsados com etanol ou acetona e devem ser colocados em estufa para a completa secagem, sendo tampados em seguida.

No caso de carência de vidros âmbar, o vidro transparente pode ser usado e coberto com papel alumínio para evitar a foto degradação dos analitos de interesse. A tampa dos frascos devem ser de PTFE ou silicone, caso contrário, use papel alumínio como uma tampa antes de inserir a própria tampa do frasco.

Para a coleta use luvas nitrílicas e evite contato da amostra com a pele, evite também o uso de hidratantes ou cremes nas mãos, pois estes podem conter compostos estrogênicos. O recipiente (geralmente balde) usado para a captura da amostra também deve ser de PTFE ou de alumínio, recomenda-se a rinsagem do balde com a própria amostra antes da coleta.

### 2.2. Transporte

Leve as amostras para o laboratório imediatamente após a coleta e mantenha-as resfriada durante todo o transporte (2 a 8° C). Atente-se que essa temperatura é para o interior do isopor ou cooler e não a temperatura da amostra em si.

### 2.3. Preparo

O preparo da amostra irá variar de acordo com as características inerentes a elas. A decisão de filtração e concentração, ou não, deverá ser baseada em conhecimentos prévios da amostra a ser analisada, assim como a decisão da análise da fase dissolvida e particulada da amostra. No entanto, essas informações devem sempre ser reportadas.

Recomenda-se que o preparo das amostras siga o fluxograma da Figura 10 desta tese, no entanto outros métodos de extração e concentração das amostras também podem ser aplicados.

### 3. Preparo das soluções

As soluções foram preparadas de acordo com o protocolo previamente estabelecido por Routledge e Sumpter (1996), conforme especificado no ANEXO 1

### 4. Realização do ensaio

#### 4.1. Armazenamento, cultivo e preparo da levedura para o ensaio YES

A levedura deve ser armazenada em tubos criogênicos de 2 mL e congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$  pelo prazo máximo de 12 meses. Ou a  $-20^{\circ}\text{C}$  por até 6 meses. Deve-se utilizar glicerol estéril (40%) para o congelamento. O descongelamento deve ser realizado em cabine de segurança biológica ou fluxo laminar e todo o conteúdo do tubo criogênico deve ser vertido em um frasco T contendo 10 mL de meio de cultivo. O frasco T deve ser incubado em uma incubadora de agitação orbital por  $48 \pm 4$  horas, a  $28^{\circ}\text{C}$ , a 150 rpm. Em seguida deve-se retirar uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  e adicionar em um novo frasco T

contendo 10 mL de meio de cultivo e ser novamente incubado em agitação orbital por mais  $24 \pm 4$  horas, a  $28^\circ\text{C}$ , a 150 rpm.

Para o preparo da levedura que será inoculada no ensaio recomenda-se o conhecimento da curva de correlação entre densidade celular e densidade ótica no equipamento/laboratório em que o ensaio será realizado. O cultivo deve conter  $2,8 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$ , o que corresponde a 1 de abs para o laboratório e equipamentos em que o ensaio foi implementado. Caso ultrapasse essa densidade celular, deve-se realizar a diluição em meio de cultivo. Caso não atinja deve-se centrifugar o cultivo (utilizando um frasco esterilizado), e utilizar as células concentradas no fundo do frasco, de forma a atingir a absorvância correspondente a  $2,8 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$ .

O uso de erlenmyer ou outro frasco estéril no lugar do frasco T, não altera os resultados, no entanto, o frasco utilizado deve possuir espaço interno suficiente para que o cultivo possa ser agitado na incubadora de agitação orbital.

A abertura do frasco contendo levedura só pode ser realizada na cabine de segurança biológica ou em fluxo laminar e a alíquota utilizada para a leitura da absorvância deve ser descartada.

#### 4.2. Inoculação da levedura no meio de análise para o ensaio

O meio de análise deve ser preparado de acordo com a quantidade de amostras a serem analisadas. Em cada placa de ensaio se analisa 2 amostras (o controle positivo é contabilizado como uma amostra) e necessita do volume de 20 mL de meio de análise, considerando as perdas do processo.

O meio de análise é composto por meio de cultivo + levedura + CPRG. A densidade celular inicial no meio de análise pode variar de acordo com as amostras a serem analisadas. Podendo ser  $1,35 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  para amostras com maior concentração de xenoestrogênios e  $2,7 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  para amostras com menor concentração de xenoestrogênios.

Sendo assim, a densidade final de levedura e a concentração final de CPRG no meio de análise para amostras com maior concentração de xenoestrogênios devem ser  $1,35 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  e 100 mg  $\text{L}^{-1}$ , respectivamente. Portanto, considerando o uso de uma placa de ensaio, utiliza-se 20 mL de meio de cultivo + 20  $\mu\text{L}$  da levedura preparada no item 4.1. do APÊNDICE 2 + 2 mg de CPRG. Enquanto para amostras com maior concentração de xenoestrogênios deve-se utilizar  $2,7 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ , e, portanto, considerando o uso de uma placa de ensaio utiliza-se 20 mL de meio de cultivo + 40  $\mu\text{L}$  da levedura preparada no item 4.1. do APÊNDICE 2+ 2 mg de CPRG.

### 4.3. Preparo das diluições das amostras e do controle positivo E2

Deve-se realizar a diluição serial das amostras e do controle positivo E2, para isto utiliza-se uma placa de 96 poços, onde em uma fileira de 12 poços se realizará 12 diluições conforme a Tabela B para amostras em etanol (amostras concentradas) e conforme a Tabela C para amostras em solução aquosa (amostras sem concentrar). Atente-se que os 11 primeiros poços ficarão com o volume final de 100  $\mu\text{L}$  e o 12º poço ficará com o volume final de 200  $\mu\text{L}$ .

Tabela B – Preparo das diluições das amostras concentradas e do controle positivo E2 em etanol

Poço na placa de diluição	Exemplo	Fator de diluição
POÇO 1	200 $\mu\text{L}$ da amostra ou da solução de E2 (54, 48 $\text{ug L}^{-1}$ )	1
POÇO 2	100 $\mu\text{L}$ do poço 1 + 100 $\mu\text{L}$ de etanol	2
POÇO 3	100 $\mu\text{L}$ do poço 2 + 100 $\mu\text{L}$ de etanol	4
POÇO 4	100 $\mu\text{L}$ do poço 3 + 100 $\mu\text{L}$ de etanol	8
POÇO 5	100 $\mu\text{L}$ do poço 4 + 100 $\mu\text{L}$ de etanol	16
POÇO 6	100 $\mu\text{L}$ do poço 5 + 100 $\mu\text{L}$ de etanol	32
POÇO 7	100 $\mu\text{L}$ do poço 6 + 100 $\mu\text{L}$ de etanol	64
POÇO 8	100 $\mu\text{L}$ do poço 7 + 100 $\mu\text{L}$ de etanol	128
POÇO 9	100 $\mu\text{L}$ do poço 8 + 100 $\mu\text{L}$ de etanol	256
POÇO 10	100 $\mu\text{L}$ do poço 9 + 100 $\mu\text{L}$ de etanol	512
POÇO 11	100 $\mu\text{L}$ do poço 10 + 100 $\mu\text{L}$ de etanol	1024
POÇO 12	100 $\mu\text{L}$ do poço 11 + 100 $\mu\text{L}$ de etanol	2048

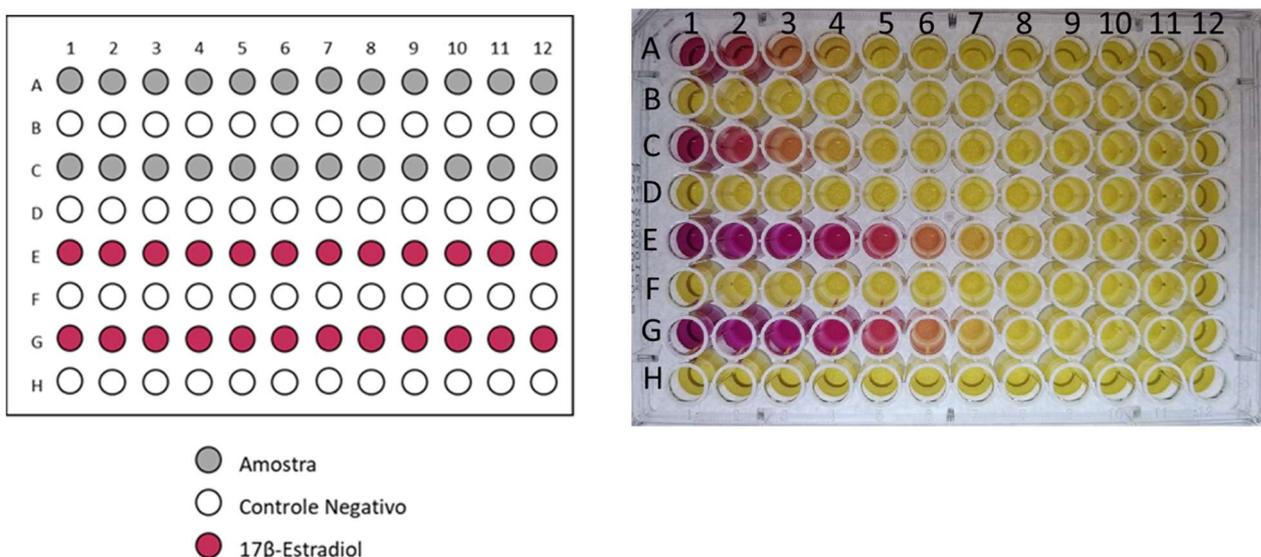
Tabela C – Preparo das diluições das amostras sem concentração e do controle positivo E2 em solução aquosa

Poço na placa de diluição	Exemplo	Fator de diluição
POÇO 1	200 $\mu\text{L}$ da amostra ou da solução de E2 (54, 48 $\text{ug L}^{-1}$ )	1
POÇO 2	100 $\mu\text{L}$ do poço 1 + 100 $\mu\text{L}$ de água ultrapura	2
POÇO 3	100 $\mu\text{L}$ do poço 2 + 100 $\mu\text{L}$ de água ultrapura	4
POÇO 4	100 $\mu\text{L}$ do poço 3 + 100 $\mu\text{L}$ de água ultrapura	8
POÇO 5	100 $\mu\text{L}$ do poço 4 + 100 $\mu\text{L}$ de água ultrapura	16
POÇO 6	100 $\mu\text{L}$ do poço 5 + 100 $\mu\text{L}$ de água ultrapura	32
POÇO 7	100 $\mu\text{L}$ do poço 6 + 100 $\mu\text{L}$ de água ultrapura	64
POÇO 8	100 $\mu\text{L}$ do poço 7 + 100 $\mu\text{L}$ de água ultrapura	128
POÇO 9	100 $\mu\text{L}$ do poço 8 + 100 $\mu\text{L}$ de água ultrapura	256
POÇO 10	100 $\mu\text{L}$ do poço 9 + 100 $\mu\text{L}$ de água ultrapura	512
POÇO 11	100 $\mu\text{L}$ do poço 10 + 100 $\mu\text{L}$ de água ultrapura	1024
POÇO 12	100 $\mu\text{L}$ do poço 11 + 100 $\mu\text{L}$ de água ultrapura	2048

#### 4.4. Preparo da placa de ensaio

As amostras e o controle positivo são realizadas em duplicatas e sempre intercaladas com fileiras de controle negativo a fim de evitar contaminação cruzada na placa (Figura A).

Figura A – Arranjo da placa de ensaio contendo 1 amostra, 1 controle positivo E2 e controle negativo intercalando com as fileiras de amostras e controle positivo. Fileiras B, D, F, H – controle negativo; fileiras A e C – 12 diluições amostra; fileiras E e G – 12 diluições do controle positivo E2



##### 4.4.1. Amostras concentradas e controle positivo E2 em etanol

Adiciona-se 10  $\mu$ L de etanol absoluto (grau hplc) nas fileiras referentes aos controles negativos, (fileiras B, D, F, H), 10  $\mu$ L de cada diluição da amostra (fileiras A e C) e 10  $\mu$ L de cada diluição do controle positivo E2 (fileiras E e G) (Figura A). Em seguida, adiciona-se, em todos os poços, 200  $\mu$ L do meio de análise contendo meio de cultivo, levedura e CPRG. A adição do meio de análise precisa ser realizada com cautela para que a ponteira não encoste nos poços e contamine o ensaio.

#### 4.4.2. Amostras sem concentração e controle positivo E2 em solução aquosa

Adiciona-se 10  $\mu\text{L}$  de água ultrapura nas fileiras referentes aos controles negativos, (fileiras B, D, F, H), 10  $\mu\text{L}$  de cada diluição da amostra (fileiras A e C) e 10  $\mu\text{L}$  de cada diluição do controle positivo E2 (fileiras E e G) (Figura A). Em seguida, adiciona-se, em todos os poços, 190  $\mu\text{L}$  do meio de análise contendo meio de cultivo, levedura e CPRG. A adição do meio de análise precisa ser realizada com cautela para que a ponteira não encoste nos poços e contamine o ensaio.

#### 4.5. Agitação das placas e incubação do ensaio

Após o preparo das placas de ensaio estas devem ser agitadas por 2 minutos na agitadora de placas e incubadas por 72 horas para amostras com menor concentração de estrogênios ou 48 horas para amostras com maior concentração de estrogênios. No caso de não conhecimento das características das amostras, recomenda-se a incubação por 72 horas.

#### 4.6. Mensuração da resposta do ensaio

Findado o tempo de incubação das placas de ensaio, estas devem ser lidas nos comprimentos de onda de 575 e 620 nm e a partir das leituras de absorvância, os dados devem ser analisados em termos de absorvância corrigida (Eq. 1).

$$\text{Abs}_{\text{corr}}(\text{amostra}) = \text{Abs}_{575}(\text{amostra}) - (\text{Abs}_{620}(\text{amostra}) - \text{Abs}_{620}(\text{controle negativo})) \quad \text{Eq 1}$$

As curvas de dose-resposta devem ser elaboradas usando absorvâncias médias corrigidas versus concentrações em escala logarítmica (em  $\text{ng L}^{-1}$  para o controle positivos e

porcentagem para extratos de amostras ambientais). Curvas padrão do controle positivo E2 deve ser ajustada a uma função logística simétrica.

A atividade estrogênica das amostras ambientais é obtida em equivalentes de estradiol (EQ-E2) através da interpolação entre a curva dose-resposta do controle E2 e os dados das amostras, utiliza-se o modelo logístico apresentado na Equação 2.

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

Onde  $A_1$  e  $A_2$  são para os valores de absorvância corrigida máxima e mínima da curva E2 ajustada,  $x_0$  é a CE50 para E2 em  $\text{ng L}^{-1}$ ,  $p$  é a inclinação da curva sigmoidal e  $(x, y)$  é o par ordenado relacionado a uma concentração de amostra e sua resposta na absorvância corrigida.

O EQ-E2 ficou sendo o menor  $y$  que elucidou uma resposta agonista, multiplicado pelo fator de diluição (FD) usado no ensaio e dividido pelo fator de concentração (FC) da EFS (Eq. 3).

$$\text{EQ} - \text{E2} = \frac{y \cdot \text{FD}}{\text{FC}} \quad \text{Eq. 3}$$

A atividade estrogênica dos compostos orgânicos é derivada de suas potências relativas (PR), que é definida como a razão entre a CE50 do E2 e a CE50 da substância analisada (Eq. 4).

$$\text{PR} = \frac{\text{CE50}_{(17\beta\text{-estradiol})}}{\text{CE50}_{(\text{substância})}} \quad \text{Eq. 4}$$

A citotoxicidade, ou seja, a inviabilização ou a inibição do crescimento das células de levedura ocasionadas pela amostra deve sempre ser avaliada e quantificada através da absorvância a 620 nm, seguindo a Eq. 5.

$$Citotoxicidade = 1 - \left( \frac{Abs_{620} (amostra)}{Abs_{620} (controle\ negativo)} \right) \quad \text{Eq. 5}$$

Os valores negativos e nulos são interpretados como ausência de toxicidade, enquanto os valores positivos indicaram inibição do crescimento da levedura e são expressos em porcentagem.

Para o cálculo dos limites de detecção e quantificação do ensaio baseou-se na curva do controle positivo E2 realizada com 12 diluições em série 1: 1. O LD foi definido como 1,1 vezes a concentração imediatamente abaixo da menor diluição detectada de E2. O limite de quantificação (LQ) foi definido como 3 vezes o LD. Estes cálculos foram definidos em nosso laboratório após a observação das curvas sigmóides e da expressão da atividade estrogênica do controle positivo E2, onde, como margem de segurança, foi adicionado 10% do valor da concentração nominal imediatamente abaixo da menor diluição detectada de E2 para o cálculo do LD. Posteriormente, a concentração foi dividida pelo respectivo fator de concentração final da amostra e multiplicada pelo fator de diluição aplicado no ensaio. Os limites são estabelecidos a cada 20 ensaios juntamente com a carta controle e, portanto, não são fixados, havendo variação sazonal.

**APÊNDICE 3 – EQ-E2 estimados e observados das misturas analisadas**

Ensaio	Obs/Estim	EQ-E2											
		E2+EE2+E1+E3	E2+EE2+E1+E3+BPA	E2+EE2	E2+E1	E2+E3	E2+BPA	EE2+E1	EE2+E3	EE2+BPA	E1+E3	E1+BPA	E3+BPA
I	Obs	29.86	29.56	31.38	31.90	28.41	29.78	26.30	27.58	58.12	29.95	29.21	32.28
	Obs	27.94	28.42	32.79	32.40	27.20	32.38	26.89	29.17	48.16	28.95	27.40	28.96
	Estim	17.33	26.16	23.98	22.12	14.23	20.32	12.41	14.57	41.99	14.34	20.53	21.73
II	Obs	44.93	45.25	36.16	38.31	32.33	42.91	28.89	36.17	49.05	34.47	34.17	36.33
	Obs	52.12	49.54	37.56	39.94	37.40	50.01	32.01	41.19	45.53	39.88	37.34	52.99
	Estim	99.49	28.40	23.78	22.58	74.41	49.48	25.08	76.91	54.48	75.71	26.04	155.74
III	Obs	14.59	18.61	18.54	17.01	17.01	21.26	16.54	15.05	20.39	16.26	16.49	16.82
	Obs	15.15	21.25	20.39	17.99	19.08	24.91	18.82	17.00	23.45	16.65	20.57	19.78
	Estim	21.64	11.45	19.54	11.99	32.15	31.36	11.12	31.28	27.87	33.50	18.38	58.71
IV	Obs	23.54	17.50	-	19.69	18.25	22.35	15.41	17.98	20.80	15.33	15.93	14.97
	Obs	27.30	13.84	-	21.74	18.58	27.53	17.44	18.19	25.15	24.21	18.00	18.35
	Estim	44.82	6.05	-	11.54	33.15	35.64	11.67	16.64	36.14	34.05	19.63	62.84

(Obs) EQ-E2 observado no ensaio YES

(Estim) EQ-E2 estimado, de acordo com a concentração analisada e a PR do composto, para o ensaio YES

(-) não realizado

## APÊNDICE 4 – ANOVA Misturas

Fonte	Df	Sum Sq	Mean Sq	F-value	P-value
E2+EE2+E1+E3					
Desvio do valor estimado	1	2.21	2.21	0.09	0.773
Resíduos	7	172.07	24.58		
E2+EE2+E1+E3+BPA					
Desvio do valor estimado	1	175	175	3.92	0.0882
Resíduos	7	312.5	44.6		
E2+EE2					
Desvio do valor estimado	1	99.03	99.03	7.921	0.0374
Resíduos	5	62.51	12.5		
E2+E1					
Desvio do valor estimado	1	192	192.04	11.52	0.0115
Resíduos	7	116.7	16.67		
E2+E3					
Desvio do valor estimado	1	33.51	33.51	1.967	0.204
Resíduos	7	119.25	17.04		
E2+BPA					
Desvio do valor estimado	1	1	1	0.04	0.847247
Resíduos	7	170.3	24.3		
EE2+E1					
Desvio do valor estimado	1	131.84	131.84	12.996	0.00868
Resíduos	7	71.01	10.14		
EE2+E3					
Desvio do valor estimado	1	35.7	35.7	2.275	0.1752
Resíduos	7	109.8	15.69		
EE2+BPA					
Desvio do valor estimado	1	48.7	48.7	2.559	0.154
Resíduos	7	133.1	19		
E1+E3					
Desvio do valor estimado	1	0.1	0.07	0.001	0.9717
Resíduos	7	369.3	52.76		
E1+BPA					
Desvio do valor estimado	1	13.1	13.1	1.148	0.32
Resíduos	7	79.8	11.4		
E3+BPA					
Desvio do valor estimado	1	2361	2361	2.712	0.1436
Resíduos	7	6093	870		

**APÊNDICE 5** – Valores de EQ-E2 (faixas, frequências de detecção, média, mediana e valores de desvio padrão) e citotoxicidade (frequência e valor máximo) das matrizes ambientais analisadas

Matriz ambiental	n	Atividade estrogênica				Citotoxicidade	
		Faixa <sup>a</sup>	Freq. (%) <sup>b</sup>	Média <sup>b</sup>	Mediana <sup>b</sup>	Freq. (%)	Max. (%) <sup>c</sup>
Água superficial	54	< LD - 82.9	74	12.6	5.5	4	95
Água superficial (material particulado)	4	15.5 - 34.5	100	25.2	25.5	75	87.5
Água potável	21	< LD - 3.5	9.5	2.5	2.5	0	-
Afluente de ETE	9	< LD - 122.6	78	49.3	38.0	22	92.5
Efluente de ETE.	8	< LD - 10.6	88	3.0	1.2	0	-
Lixiviado bruto de aterro sanitário	8	< LD - 794.3	67	402.4	392.2	0	-
Lixiviado bruto de aterro sanitário (Material particulado)	4	163 - 1077	100	161.0	851.5	0	-
Lixiviado tratado de aterro sanitário	1	120.3	-	-	-	0	-
Sedimento	28	< LD - 11.9	46	2.2	1.0	61	95.3

<sup>a</sup> EQ-E2 valores em ng L<sup>-1</sup> para matrizes aquosas e em ng g<sup>-1</sup> para sedimentos.

<sup>b</sup> Frequência de detecção, média, mediana e valores de desvio padrão calculados com base em amostras acima do LD.

<sup>c</sup> Citotoxicidade máxima observada

**APÊNDICE 6** – Resultados de EQ-E2 e citotoxicidade referentes à fase dissolvida das amostras ambientais de água potável, água superficial, afluente e efluente de ETE e lixiviado bruto e tratado de aterro sanitário

<b>Matriz ambiental</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Ano de coleta</b>	<b>EQ-E2 (ng L-1)</b>	<b>Desvio</b>	<b>Citotoxicidade (%)</b>
Água potável	Torneira	2015	<LD	-	-
			1.47	0.66	-
			10.1	1.33	-
			<LD	-	-
			<LD	-	-
			<LD	-	-
			<LD	-	-
			12.28	1.64	-
			3.49	0.1	-
			12.05	0.44	-
			<LD	-	-
			<LD	-	-
			<LD	-	-
			<LD	-	-
			<LD	-	-
			<LD	-	-
			<LD	-	-
			<LD	-	-
			<LD	-	-
			<LD	-	-
Água superficial	Rio Guandu	2018	7.9	1	-
			5.7	0.6	94
			5.4	1.2	95
			16.7	0.7	-
			12.7	1.3	-
			<LD	0	-
			<LD	0	-
		2015	0.47	0.11	-
			15.61	1.85	-
			4.43	0.14	-
			0.28	0	-
			1.12	0.2	-
			<LD	-	-

*Continua*

*Continuação Apêndice 6*

Resultados de EQ-E2 e citotoxicidade referentes à fase dissolvida das amostras ambientais de água potável, água superficial, afluentes e efluentes de ETE e lixiviado bruto e tratado de aterro sanitário

<b>Matriz ambiental</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Ano de coleta</b>	<b>EQ-E2 (ng L-1)</b>	<b>Desvio</b>	<b>Citotoxicidade (%)</b>
Água superficial	Rio Guandu	2015	<LD	-	-
			55.71	19.04	-
			82.87	6.25	-
			21.64	4.58	-
			18.58	3.14	-
			10.17	0.53	-
			10.04	1.01	-
			22.74	1	-
			13.59	2.44	-
			2.17	0.34	-
			1.77	0.09	-
			<LD	-	-
			<LD	-	-
			<LD	-	-
			<LD	-	-
			<LD	-	-
			0.54	0.11	-
			1.01	0.18	-
			<LD	-	-
			<LD	-	-
			1.2	0.06	-
			1.28	0.04	-
			11.55	0.52	-
			31.49	4	-
			33.33	0.52	-
			<LD	-	-
<LD	-	-			
<LD	-	-			
1.18	0.03	-			
1.28	0.02	-			
<LD	-	-			
<LD	-	-			
0.41	0.08	-			
1.08	0.04	-			

*Continua*

*Continuação Apêndice 6*

Resultados de EQ-E2 e citotoxicidade referentes à fase dissolvida das amostras ambientais de água potável, água superficial, afluente e efluente de ETE e lixiviado bruto e tratado de aterro sanitário

<b>Matriz ambiental</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Ano de coleta</b>	<b>EQ-E2 (ng L-1)</b>	<b>Desvio</b>	<b>Citotoxicidade (%)</b>
Água superficial	Rio Guandu	2015	1.81	0.03	-
			1.04	0.1	-
			0.87	0.06	-
			0.51	0.02	-
			0.51	0.07	-
	Rio Maracanã	2018	19,2	1.8	55
			38,8	0.5	65
			30,39	0.4	47
			17,84	0.7	38
	Lixiviado bruto	Seropédica	2017	<LD	-
2018				22	2
2015			<LD	-	-
			<LD	-	-
Nova Iguaçu		2015	115.61	15.91	-
			698.19	62.48	-
			603.92	1.95	-
			794.28	107.05	-
Lixiviado Tratado	Seropédica	2015	120.27	15.69	-
Afluente de ETE	ETE Deodoro	2015	<LD	-	-
			<LD	-	-
			6.3	1.02	-
			39.68	2.36	87.5
			35.17	3.95	-
			37.97	5.09	92.5
			3.16	0.62	-
			99.96	7.15	-
			122.55	0.08	-
Efluente de ETE	ETE Deodoro		0.7	0.05	-
			<LD	-	-
			4.46	0.64	-
			2.55	0.23	-
			0.79	0.11	-
			0.69	0	-
			1.22	0.1	-
			10.57	1.03	-

**APÊNDICE 7** – Resultados de EQ-E2 e citotoxicidade referentes ao material particulado  $< 0.7$  e  $> 0.7 \mu\text{m}$  e às amostras sem a realização das etapas de filtração e concentração por EFS

<b>Matriz ambiental</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Ano de coleta</b>	<b>EQ-E2 particulado (<math>\text{Ø} &gt; 0,70 \mu\text{m}</math>) (ng L-1)</b>	<b>Desvio</b>	<b>Toxicidade (%)</b>	<b>EQ-E2 particulado (<math>&lt; 0,70 \mu\text{m}</math>) (ng L-1)</b>	<b>Desvio</b>	<b>Toxicidade (%)</b>	<b>EQ-E2 Sem EFS (ng L-1)</b>	<b>Desvio</b>	<b>Toxicidade (%)</b>
Água superficial	Rio Maracanã	2018	3.1	0.4	87.5	12.4	1.1	-	-	-	-
			2.5	0.3	-	18.7	0.2	-	-	-	-
			<LD		86.4	34.5	1.8	-	-	-	-
			<LD		86.7	29.7	1.4	-	-	-	-
Lixiviado Bruto	Seropédica	2017	349.0	22.0	-	311.0	11.0	-	< LD	-	-
			2018	380.0	30.0	-	342.0	3.0	-	837.0	128.0
		2018	237.0	50.0	-	744.0	13.0	-	707.0	382.0	-
			318.0	19.0	-	759.0	150.0	-	604.0	88.0	-

**APÊNDICE 8** – Resultados de EQ-E2 e citotoxicidade referentes ao extrato de sedimentos

<b>Matriz ambiental</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Ano de coleta</b>	<b>EQ-E2 (ng g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Desvio</b>	<b>Citotoxicidade (%)</b>
Sedimento	Canal do Cunha	2016	0.1	0.002	-
			0.2	0.03	-
			1.0	0.07	-
			4.3	0.22	48.9
			1.5	0.25	90.9
			11.9	1.01	93.5
			1.4	0.43	89.1
			<LD	-	89.6
			<LD	-	92.9
	0.9	0.02	92.3		
	Baía de Ganabara	2016	<LD	-	94.1
			<LD	-	92.0
			<LD	-	90.7
			<LD	-	94.1
			<LD	-	88.3
			<LD	-	94.4
			<LD	-	95.3
			<LD	-	94.5
			<LD	-	93.9
0.1			0.01	-	
0.3	0.01	-			
0.1		-			
Praia em Angra dos Reis	2017	<LD	-	-	
		<LD	-	27.0	
		<LD	-	-	
		4.2	1.10	-	
		<LD	-	-	
1.9	0.07	-			

## ANEXO 1 – Preparo das soluções do ensaio YES

### Meio mínimo

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

13,61 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

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

4,2 g de  $\text{KOH}$

0,2 g de  $\text{MgSO}_4$

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

50 mg de L-leucina

50 mg de L-histidina

50 mg de adenina

20 mg de L-arginina

20 mg de L-metionina

30 mg de L-tirosina

30mg de L-isoleucina

30 mg de L-lisina-HCl

25 mg de L-fenilalanina

100 mg de ácido glutâmico

150 mg de L-valina

375 mg de L-serina.

### Solução de glicose

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

### Solução de ácido L-aspártico

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

### Solução de L-treonina

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

### Solução de sulfato de cobre (II)

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

### *Continuação Anexo 1*

Preparo das soluções do ensaio YES

#### **Solução de vitamina**

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

8 mg de tiamina

8 mg de piridoxina

8 mg de pantetonato de cálcio

40 mg de inositol

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

#### **Solução de CPRG (Clorofenol vermelho- $\beta$ -D-galactopiranosida)**

Foi adicionado diretamente ao meio de cultivo, na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>.

#### **Meio de Cultivo**

5 mL de solução de glucose

1,25 mL de solução de ácido L-aspartico

0,5 mL de solução de vitamina

0,4 mL de solução de L-treonina

125 $\mu$ L de solução de sulfato de cobre (II)

45 mL de meio mínimo

#### **Meio de análise**

Meio de cultivo + células de levedura ( $1,35 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>) + CPRG (100 mg L<sup>-1</sup>)

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

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

As soluções de L-treonina, vitamina e meio de cultivo foram armazenadas à temperatura de 4°C. Todas as demais foram armazenadas em temperatura ambiente. O CPRG foi adicionado ao meio de cultivo somente na hora da realização do ensaio.