

## I-178 - AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ATIVIDADE ESTROGÊNICA NOS SEDIMENTOS DE FUNDO DA ENSEADA DE JURUJUBA-RJ

**Ana Dalva de Oliveira Santos<sup>(1)</sup>**

Licenciada em Geografia na Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Pós Graduada na Fundação Oswaldo Cruz em Promoção de Espaços Saudáveis e Sustentáveis. Mestre em Geologia e Geofísica Marinha na Universidade Federal Fluminense.

**Daniele Maia Bila<sup>(2)</sup>**

D.Sc.Professora. Adjunta. Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental-PEAMB Laboratório de Engenharia Sanitária (LES).Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente (DESMA). Faculdade de Engenharia (FEN). Universidade do Estado do Rio de Janeiro UERJ.

**José Antonio Baptista Neto<sup>(3)</sup>**

Ph. D. Professor Adjunto. Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Dinâmica dos Oceanos e da Terra da Universidade Federal Fluminense/UFF - Departamento de Geologia e Geofísica/LAGEMAR - Instituto de Geociências.

**Marília Teresa Lima do Nascimento<sup>(4)</sup>**

Mestre em Geologia e Geofísica Marinha. Doutoranda do Programa de Pós-Graduação Dinâmicas dos Oceanos e da Terra da Universidade Federal Fluminense - UFF.

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Rua Mentor Couto, 2532 Fds – Engenho Pequeno – São Gonçalo - RJ - CEP: 24417-000 - Brasil - Tel: (21) 9919-6196 - e-mail: [santosandalva@gmail.com](mailto:santosandalva@gmail.com)

### RESUMO

Recentemente cientistas tem se debruçado sobre o estudo de micropoluentes e sua interferência no ambiente, desreguladores ou perturbadores como são conhecidas essas substâncias, vem sendo pesquisadas e tem causado preocupação por sua capacidade em alterar o sistema endócrino, influenciando no desenvolvimento humano e animal. A detecção dos desreguladores endócrinos torna-se difícil devido as baixas concentrações presentes no ambiente, mas configura-se necessário para avaliar o risco que apresentam. A Enseada de Jurujuba inserida em uma área com alto grau de urbanização, além de se constituir como parte da Baía de Guanabara, uma das baías mais poluídas do mundo, tem a importância de suas águas relacionada também à atividade de transporte marítimo que faz a interligação entre os municípios de Niterói e Rio de Janeiro e uma das atividades econômicas da região, a pesca. Este ecossistema pode ser considerado como um corpo receptor de toda a poluição urbana veiculada nos bairros ao redor da enseada. Este estudo tem como objetivo determinar a atividade estrogênica em sedimentos de fundo utilizando o ensaio Yeast Estrogen Screen Assay (YES) e produzindo dados para o processo de avaliação da contaminação da área da Enseada de Jurujuba, fornecendo subsídios para a adoção de medidas que venha a ser adotada, tendo em vista o uso futuro da área e a saúde da população.

**PALAVRAS-CHAVE:** Sedimentos, Desreguladores endócrinos, Atividades estrogênicas, Ensaio YES.

### INTRODUÇÃO

Pesquisas acerca da atividade estrogênica apontam riscos de contaminação em rios, lagos, estuários e águas subterrâneas. Contudo, a grande preocupação ambiental não é necessariamente o volume de produção dos desreguladores endócrinos (DEs), mas a persistência; atividade biológica; toxicidade e bioacumulação. Uma vez que seus efeitos ecotoxicológicos são projetados para atingir órgãos ou rotas metabólicas e moleculares específicas provocando, efeitos colaterais importantes no ambiente aquático (REIS FILHO et al, 2007).

Atualmente, é crescente o interesse da comunidade científica acerca da presença de micropoluentes no meio ambiente devido ao seu potencial adverso na saúde humana e animal. Substâncias sintéticas e naturais de diferentes classes químicas vêm sendo detectadas na faixa de  $\mu\text{g L}^{-1}$  a  $\text{ng L}^{-1}$ , principalmente em ambientes aquáticos (BILA, 2005).

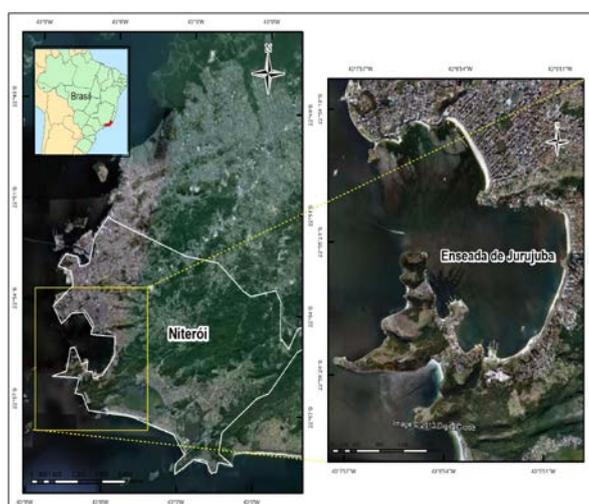
Estudos realizados na Baía de Guanabara, onde está inserida a Enseada de Jurujuba apontam, para um elevado grau de contaminação deste ecossistema (KJERFVE, et al, 2003; CATANZARO et al. 2004; BAPTISTA NETO et al., 2006). Cercada pela segunda maior aglomeração urbana do país, a Baía da Guanabara apresenta cerca de 10 milhões de habitantes representada pela região metropolitana do Rio de Janeiro contribuindo com uma carga de esgotos domésticos acima de  $20 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  dos quais, apenas 25% recebem algum tipo de tratamento. Evidenciando sérios problemas de saúde pública, pela inadequada gestão dos esgotos domésticos e industriais, (VILELA, et al. 2004).

A Baía de Guanabara, onde está localizada a Enseada de Jurujuba, recebe extenso aporte de esgotos domésticos, este ecossistema vem sofrendo os efeitos do crescimento indiscriminado, a presença de indústrias, refinarias de petróleo, terminais marítimos, lixões, e uma intensa atividade agrícola que introduzem diversos poluentes para ambiente.

Na Enseada de Jurujuba, as principais fontes de esgoto segundo Baptista Neto,(1999) são os rios Cachoeira e Icaraí, além de vários córregos e despejos domésticos diretos neste corpo hídrico. Tais fatos apontam para a importância de trabalhos que contribuam para elucidar a problemática da contaminação humana e ambiental pela presença de micropoluentes.

Neste caso, o conhecimento do grau dos contaminantes na Enseada de Jurujuba poderá se constituir um indicador da ocorrência e concentrações de poluentes, fato que aliado a dados ecotoxicológicos, e ensaios da atividade estrogênica identificará possíveis concentrações em seus compartimentos.

A área de estudo, apresentada na Figura 1, tem em seu entorno alto grau de ocupação desordenada em direção as encostas, fato que contribui para consideráveis processos erosivos e aumento no índice de poluição dos sedimentos.



**Figura 1 – Mapa da localização geográfica da área de estudo**

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

As amostras de sedimentos de fundo foram coletadas na Enseada de Jurujuba (Baía de Guanabara) no dia 06 de maio de 2012. Os sete pontos de coleta foram realizados em áreas de maior dispersão da enseada e os sedimentos retirados com draga Van-Veen em direção à aglomeração dos barcos de pesca; da criação de mexilhões; de áreas com exposição de esgoto; próximo ao rio Cachoeiras e nos arredores.

Os sedimentos coletados foram imediatamente armazenados em sacos zipados e mantidos em temperatura controlada, em caixas térmicas, durante o transporte até o laboratório. No laboratório as amostras foram mantidas a 4°C no refrigerador até a execução dos ensaios.

A metodologia utilizada no preparo das amostras foi descrita pela EMBRAPA (2000) e Martins (2008). Inicialmente para o preparo dos sedimentos foram separados 100grs do sedimento em um becker de 250mL e adicionado água deionizada, essa suspensão ficou em repouso por 24h. O pH foi medido no início e após as 24h, a suspensão foi levada a estufa a temperatura entre 50° a 65° até secagem completa (aproximadamente 24 h), foi mantido em dessecador até a próxima etapa de preparo.

Em 2 g de pó seco foram adicionados 15mL de metanol, a mistura permaneceu no ultrassom por 30 min. Após essa etapa, a parte líquida foi separada por centrifugação (2500 giros por 5 minutos) e armazenada. Esse procedimento foi realizado 03 vezes e os líquidos combinados, somando um volume final de 12 ml. Foram adicionados 108 ml de água e acidificada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para ajuste do pH 3.

Foi utilizada a extração por fase sólida (EFS) com um cartucho C18 (3 mL e 500 mg) para extração dos analitos da amostra. O cartucho foi previamente condicionado pela passagem de 3 X 2 ml de hexano; 1 X 1mL de acetona; 3 X 2 mL de metanol e 5 X 2 mL de água Ultrapura (pH 3,0). Posteriormente, foi realizada a passagem dos 120 mL da amostra pelo cartucho. Na sequência, os analitos foram eluídos com 4 mL de acetona e o solvente levado a secura, sendo reconstituídos com 4mL de etanol e estando pronto para serem analisados no ensaio Yeast Estrogen Screen (YES).

O ensaio para avaliação da atividade estrogênica das amostras de sedimento foi realizado com base na metodologia desenvolvida por Routledge e Sumpter (1996), que determina a atividade estrogênica das amostras pelo ensaio *in vitro* YES. Uma cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* modificada geneticamente foi utilizada no ensaio.

As amostras foram diluídas em série em etanol absoluto. Um total de 10 µl alíquotas de cada concentração foi, então, transferido para uma placa de 96 poços testada e duplicada. 200 µl de cepa de meio de levedura contendo clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosido (CPRG) foram, então, adicionados; as placas foram seladas, agitadas durante 5 minutos e incubadas durante 72 horas a 30°C. Cada placa possuía linhas duplicadas contendo uma diluição em série da amostra, duplicado de etanol (controle de solvente) e uma fileira contendo uma diluição em série do 17β-estradiol (controle positivo). Após a incubação, a absorvância foi lida a 540 nm (para a cor) e a 620 nm (para turbidez), utilizando uma placa de leitura.

Para quantificar a resposta estrogênica, foi utilizada a metodologia de Andersen et al. (1999), que classifica as amostras em altamente estrogênica se a resposta ao ensaio YES for maior que 75 %.; moderadamente estrogênica se a resposta estiver entre 75 a 25 %, fracamente estrogênica se a resposta encontrar-se entre 25 a 10 % e não estrogênica ou ausente quando a resposta (absorbância) ficar abaixo de 10 % da resposta obtida para o padrão 17β-estradiol.

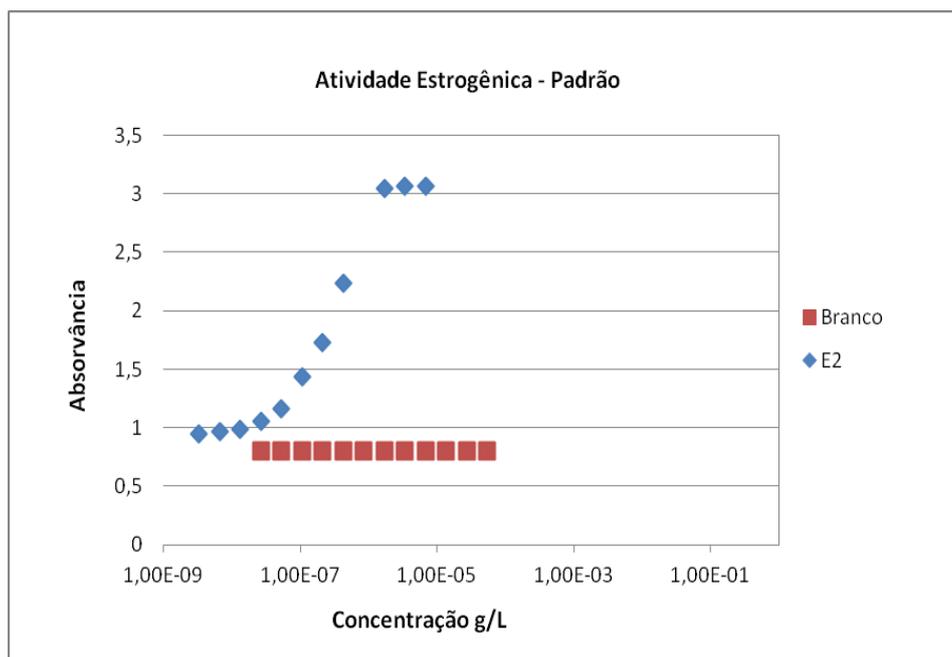
## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os sete pontos de coleta das amostras de sedimento para a avaliação da atividade estrogênica nos sedimentos de fundo da Enseada de Jurujuba na Baía de Guanabara foram estrategicamente selecionados com base no conhecimento prévio de locais de despejo de esgoto *in natura*, aglomeração de barcos de pesca (presença de antiencrustantes e óleos e graxa), além de áreas de maior dispersão da Enseada.

Os pontos 4S; 5S; 6S e 7S estão localizados em áreas de intenso despejo de esgoto *in natura*. O esgoto doméstico sem tratamento ou após tratamento convencional, apresenta substâncias estrogênicas como os hormônios naturais, contraceptivos e outras (GEROLIM, 2008; JANEX-HABIBI et al., 2009). O ponto 1S localiza-se próximo a uma fábrica de sardinha desativada.

Substâncias utilizadas como conservantes possuem comprovada atividade estrogênica e desregulação endócrina que pode ser responsável por diversos efeitos danosos aos organismos (BELFROID et al., 1999). Os pontos 2S e 3S foram escolhidos pelo uso de tintas anti-incrustantes para evitar incrustação de organismos em cascos de embarcações.

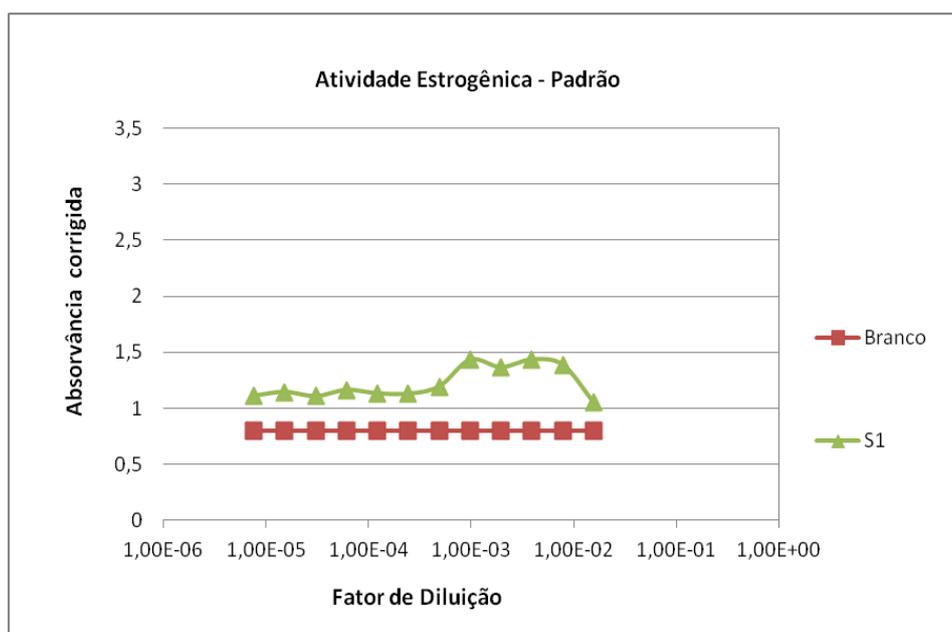
A criação de mexilhões nesta área pode se constituir um sério fator de risco, uma vez que os materiais com anti-incrustantes podem causar em organismos marinhos diversas transformações, (BORGES, 2012). A Figura 2 apresenta uma curva dose-resposta do 17β estradiol (controle positivo) obtida no ensaio YES.



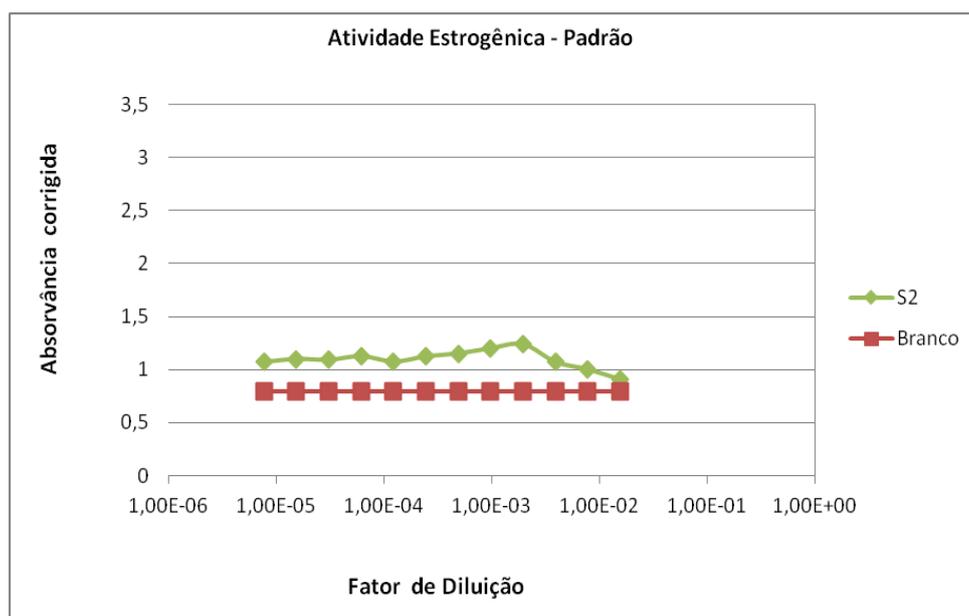
**Figura 2 - Curva dose-resposta do 17 $\beta$  estradiol obtida no ensaio YES.**

Dos sete pontos analisados, somente os sedimentos coletados nos pontos S1, S2 e S5 apresentaram uma resposta ao ensaio YES, de fracamente a moderadamente estrogênica. A Figura 3 apresenta a curva dose-resposta da amostra de sedimento coletado no ponto S1 e a Figura 4 à curva dose resposta de sedimento no ponto S2.

Nas Figuras 3 e 4, observa-se que a curva se apresenta de forma peculiar, a amostra mais concentrada não apresentou uma resposta positiva no ensaio YES. Contudo, com diluições da amostra, é possível observar uma resposta estrogênica no ensaio YES.



**Figura 3 – Curva dose-resposta do sedimento coletada no ponto S1 obtida no ensaio YES.**



**Figura 4 – Curva dose-resposta do sedimento coletada no ponto S2 obtida no ensaio YES.**

É importante salientar que em amostras ambientais, alguns fatores e poluentes podem influenciar na resposta para o ensaio YES. Estudos na literatura reportaram o impacto de algumas substâncias na resposta do ensaio YES. Denier et al (2009) avaliaram a atividade estrogênica de alguns metais (Cd, Zn, Cu, Hg e Pb) em uma larga faixa de concentração (95.4 pM to 1 mM), e observaram que em alguns casos, ocorria a inibição da resposta no ensaio YES; em outros casos, alguns metais foram capazes de potencializar a resposta ao ensaio. Segundo os autores, esse comportamento foi devido à interferência no crescimento da levedura.

As possibilidades de duas substâncias estrogênicas quando juntas são de ter uma resposta maior do que as duas substâncias sozinhas, podendo ser o efeito aditivo ou sinérgico. Também pode ocorrer o caso de uma substância não estrogênica não interferir na resposta das primeiras substâncias. Contudo, uma substância pode interferir na resposta de outra substância estrogênica. As amostras ambientais são conhecidas por sua complexidade com presença de diversas substâncias com propriedades químicas diferentes. A fim de consolidar os resultados e investigar se as amostras de sedimento foram capazes de inibir a resposta do 17  $\beta$  estradiol no ensaio YES, outros ensaios devem ser realizados

## CONCLUSÕES

As amostras de sedimento coletadas nos pontos S3, S4, S6 e S7 não apresentaram resposta ao ensaio YES. A S1, S2 e S5 apresentaram resposta de fraca à moderada. Neste caso, é importante considerar que amostras ambientais são complexas devido à quantidade e diversidade de substâncias químicas.

Embora algumas amostras não tenham apresentado atividade estrogênica no ensaio YES, sua diluição possibilitou a verificação de uma resposta ao ensaio. Contudo, isso não indica falta de atividade estrogênica, mas reflete a dificuldade da determinação da atividade estrogênica de uma matriz ambiental complexa que pode apresentar toxicidade.

Não apresentar uma resposta no ensaio YES, não quer dizer que a amostra não apresenta atividade estrogênica, pois a substância pode ser estrogênica por outro mecanismo que não o apresentado pelo ensaio YES (ligação ao RE). Sendo assim, outros ensaios devem ser utilizados para afirmar com segurança a atividade biológica da substância ou de misturas. Além disso, ensaios *in vivo* apresentam um sistema mais complexo e devem ser usados em conjunto com os ensaios *in vitro* na avaliação da atividade estrogênica das amostras.

A relevância desta pesquisa é demonstrada frente às dificuldades em trabalhar com sedimentos marinhos e elucidar respostas concernentes à análise de atividade estrogênica. Tais fatos se constituíram também na necessidade de maior aprofundamento na utilização do ensaio YES aliado a outros experimentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAPTISTA NETO, J.A.; SMITH, B.J.; MCALISTER, J.J. Sedimentological evidence of human impact on a nearshore environment: Jurujuba Sound, Rio de Janeiro State, Brazil. *Applied Geography*. Pergamon. 19 (2): 153-177, 1999.
2. BAPTISTA NETO, J. A., GINGELE F. X.; LEIPE T., BREHME I. Spatial distribution of heavy metals in superficial sediments from Guanabara Bay: Rio de Janeiro, Brazil. *Environmental Geology*. 49:1051-1063, 2006.
3. BAPTISTA NETO J.A, WALLNER-KERSANACH, M.; PATCHINEELAM, S.M (Organizadores). *Poluição Marinha*. Editora Interferência, Rio de Janeiro. 2008.
4. BILA, D.M; DEZOTTI, M. Fármacos no Meio Ambiente. *Revista Química Nova*, Vol. 26, número 4, 523-530, 2003.
5. BILA, D. M. Degradação e Remoção da Atividade Estrogênica do Desregulador Endócrino 17 $\beta$ -Estradiol pelo Processo de Ozonização, Tese de Doutorado, UFRJ/COPPE, 2005.
6. BILA, D.M., DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e. Consequências. *Química Nova*, v.30, p.651-666, 2007.
7. BIRKETT, J. W & LESTER, J. N. (2003). *Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes*. 1st Ed., Lewis Publishers. London, England.
8. BRASIL, Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), Resolução nº 357 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2005.
9. CATANZARO, L.F., BAPTISTA NETO J.A., GUIMARÃES M.S.D., SILVA C.G. 2004. Distinctive sedimentary processes in Guanabara Bay – SE/Brazil, based on the analysis of echo-character (7.0 kHz). *Revista Brasileira de Geofísica*, 22:69.
10. DENIER, et al., Estrogenic activity of cadmium, copper and zinc in the yeast estrogen screen. *Toxicology in Vitro*, Elsevier, 2009.
11. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, EMBRAPA. *Pecuária Sudeste - Resumo em anais de congresso (ALICE)*. 2008. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>>. Acesso em: 08 jul. 2012.
12. KJERFVEK, B., RIBEIRO, C., DIAS G., FILIPPO A, QUARESMA V. 1997. Oceanographic characteristics of an impacted coastal bay: Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brazil. *Continental Shelf Research*, 17(13): 1609-1643.
13. NASCIMENTO, M.T.L. Análise da Atividade Estrogênica na Água da Enseada de Jurujuba-Baía da Guanabara. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal Fluminense. 98pp. 2012.
14. REIS FILHO, R. W. BARREIRO, J. C.; VIEIRA, E. M.; CASS, Q. B. Fármacos, ETEs e Corpos hídricos. *Revista Ami-Água*, Taubaté, v. 2, n. 3, p. 54-61, 2007.
15. ROUTLEDGE, E. J., SUMPTER, J. P. Estrogenic Activity of Surfactants and Some of their Degradation Products Assessed Using a Recombinant Yeast Screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 15, n. 3, pp. 241-248, 1998.