


IV-507 - RIO DOCE E OS EFEITOS DE ESTROGENICIDADE E CITOTOXICIDADE APÓS O ROMPIMENTO DA BARRAGEM DO FUNDÃO
Júlia Paiva Almeida⁽¹⁾

Graduada de Engenharia Ambiental e Sanitária pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Giselle Gomes⁽¹⁾

Bióloga pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (RJ). Mestre e Doutora em Engenharia Ambiental pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Alex da Silva de Freitas⁽²⁾

Biólogo pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Mestre e Doutor em Dinâmica dos Oceanos e da Terra pela Universidade Federal Fluminense (UFF).

José Antônio Baptista Neto⁽²⁾

Geógrafo pela Universidade Federal Fluminense (UFF). Mestre em Geologia e Geofísica Marinha pela Universidade Federal Fluminense (UFF). Doutor em Geociências pela Queens University.

Daniele Maia Bila⁽¹⁾

Engenheira Química pela UFRRJ. Mestre e Doutora em Engenharia Química pela COPPE/UFRJ. Professor Associado do Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (DESMA/UERJ)

Endereço⁽¹⁾: Rua São Francisco Xavier, 524 - sala 5037F - Maracanã - Rio de Janeiro - RJ - CEP: 20550-013 - Brasil - Tel: (21) 96810-3167 - e-mail: juliapaiva40@gmail.com

Endereço⁽²⁾: Avenida General Milton Tavares de Souza, s/n, Campus da Praia Vermelha, sala 405 - Boa Viagem - Niterói - RJ - CEP: 24210-346 - Brasil

RESUMO

Em 2015, a barragem do Fundão, localizada em Mariana, rompeu, liberando uma grande quantidade de lama química na região. Essa lama pode conter compostos tóxicos e Desreguladores Endócrinos (DEs), os quais provocam efeitos adversos na saúde dos organismos expostos. Desreguladores Endócrinos (DEs) são substâncias exógenas ou misturas que, mesmo em baixas concentrações, 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. Detectar os DEs no meio ambiente é desafiador devido à baixa concentração desses compostos, à sua ampla variedade e à falta de legislação. O bioensaio *in vitro* *Yeast Estrogen Screen* (YES) é eficaz na detecção da atividade estrogênica de DEs em amostras ambientais e foi utilizado neste estudo para a quantificação de atividade estrogênica no sedimento da plataforma continental próxima ao Rio Doce. Os resultados mostraram atividade estrogênica nas amostras coletadas após o desastre, variando de <LD - $0,3 \pm 0,01 \text{ ng g}^{-1}$. Uma das amostras que apresentou estrogenicidade ($0,11 \text{ ng g}^{-1}$) também demonstrou citotoxicidade de 15%, o que demonstra que a atividade estrogênica encontrada nessa amostra pode ter sido subestimada, uma vez que houve uma redução de 15% do crescimento de células durante o ensaio. Além disso, também foi identificado a presença de 21% de citotoxicidade em outro ponto de coleta, impossibilitando, por completo, a identificação da atividade estrogênica dessa amostra. Portanto, mostra-se a importância do monitoramento da presença desses compostos nesta região.

PALAVRAS-CHAVE: Sedimentos, Desreguladores Endócrinos, Atividade Estrogênica, Rio Doce, Citotoxicidade.

INTRODUÇÃO

Em 2015, a barragem do Fundão, localizada no município de Mariana no Estado de Minas Gerais (Brasil), rompeu. Houve o lançamento de um grande volume de lama química na região. Segundo Lima et al. (2020), cerca de 660 quilômetros de cursos d'água foram atingidos pelos rejeitos. A lama química era composta por metais, os quais podem ser tóxicos e também atuarem como Desreguladores Endócrinos (DEs), impactando o equilíbrio e a saúde da bacia.



Os DEs 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). Vale ressaltar que estas substâncias, mesmo em baixas concentrações - da ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$ e ng.L^{-1} -, têm potencial estrogênico..

O sistema endócrino é responsável por secretar hormônios - substâncias químicas que têm funções essenciais para o funcionamento do organismo - e estas necessitam se conectar a receptores localizados na célula para exercer sua função biológica. Quando há presença de DEs, estas substâncias podem competir com os hormônios para se conectarem ao receptor. Nos casos que o DE consegue se conectar, ele substitui o hormônio e transmite sinais diferentes em tempos diferentes para a célula ou bloqueiam as funções do hormônio. Além disso, os DEs podem alterar a quantidade original de hormônio, modificando as funções endócrinas (Khetan, 2014).

Sendo assim, considerando os mecanismos de atuação do DEs no sistema endócrino, a literatura alerta sobre os potenciais efeitos adversos nos seres vivos. Na perspectiva animal, é possível observar a diminuição na eclosão de ovos de pássaros, peixes e tartarugas; feminização de peixes machos; problemas no sistema reprodutivo em peixes, répteis, pássaros e mamíferos e alterações no sistema imunológico de mamíferos marinhos (Vilela et al., 2018; Bila, 2007). Em alguns casos esses efeitos podem conduzir ao declínio da população. Na perspectiva humana, esses efeitos incluem a redução da quantidade de esperma; o aumento da incidência de câncer de mama, de testículo e de próstata; a endometriose, a síndrome do ovário policístico e, o aumento da liberação de prolactina em mulheres (Aquino et al., 2021; Vilela et al., 2018).

Apesar de onipresentes no meio ambiente, os DEs não fazem parte dos atuais programas de monitoramento ambiental (Argolo et al., 2023). Assim, surge-se a celeuma: não existindo legislações específicas para a regulação dos DEs no meio ambiente, é cada vez mais difícil compreender sua dimensão e controlar seus impactos. Portanto, o estudo dos DEs no meio ambiente ainda é um desafio, pois sem legislação e constituídos por uma ampla variedade de compostos, torna-se mais difícil a implementação de técnicas para a sua detecção e avaliação dos seus efeitos no ambiente (Felix et al., 2023).

Esses compostos têm sido encontrados nos diversos compartimentos ambientais (ar, água e solo) e suas propriedades físicas e químicas influenciam sua ação e destino no ambiente (Argolo et al., 2023). Pode-se citar como exemplo as substâncias estrogênicas que tem características moderadamente hidrofóbicas e apolares, o que faz com que se prendam a partículas sólidas orgânicas ou organismos. No caso dos sedimentos - com sua diversidade de tamanhos de partículas, minerais, matéria orgânica e outras substâncias - estes formam uma matriz ambiental complexa. Além disso, podem armazenar e liberar contaminantes na água, tornando-os acessíveis aos organismos aquáticos.

Dentre os ensaios para a análise de DEs, destaca-se o bioensaio *in vitro* *Yeast Estrogen Screen* (YES) que permite a detecção e quantificação da atividade estrogênica de DEs em amostras ambientais. Este pode prever os efeitos desencadeados em organismos expostos; fornecer ferramentas para a compreensão de mecanismo de ação envolvidos; ser facilmente utilizado em larga escala no monitoramento de DEs e seus efeitos no ambiente; bem como possui grande reprodutibilidade, repetibilidade e sensibilidade em relação às matrizes ambientais. (Gomes et al., 2023).

O ensaio YES utiliza a linhagem da levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada, com a adição de um receptor estrogênico humano (RE). Na presença de uma substância estrogênica, como um DE, o receptor é ativado, produzindo e liberando a enzima β -galactosidase. Esta enzima metaboliza o substrato cromogênico CPRG a vermelho de clorofenol (CPR), processo que é possível ver, a olho nu, a mudança de cor do meio de análise: de amarelo para vermelho.

Desta maneira, este estudo foi impulsionado pela possível presença de DEs nos corpos d'água, devido à presença de rejeitos de mineração, os quais atingiram a bacia após o rompimento da barragem do Fundão. Portanto, sedimentos provenientes da bacia do Rio Doce foram avaliados quanto à presença de atividade estrogênica e citotoxicidade pelo ensaio *in vitro* YES.



OBJETIVO

Analisar a atividade estrogênica e a citotoxicidade de sedimentos provenientes da bacia hidrográfica do Rio Doce após 2 (dois) anos do rompimento da barragem do Fundão, em Mariana - Estado de Minas Gerais, Brasil -, por meio do ensaio *in vitro* Yeast Estrogen Screen (YES).

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de sedimento superficial da plataforma continental adjacente ao Rio Doce foram coletadas com profundidades entre 15 e 40m, em incrementos de 5m de lâmina d'água, em 10 pontos após o rompimento da barragem de rejeitos do Fundão (Figura 1). As amostras foram coletadas com o auxílio de uma draga tipo Van Veen sendo posteriormente congeladas a -20°C até sua análise.

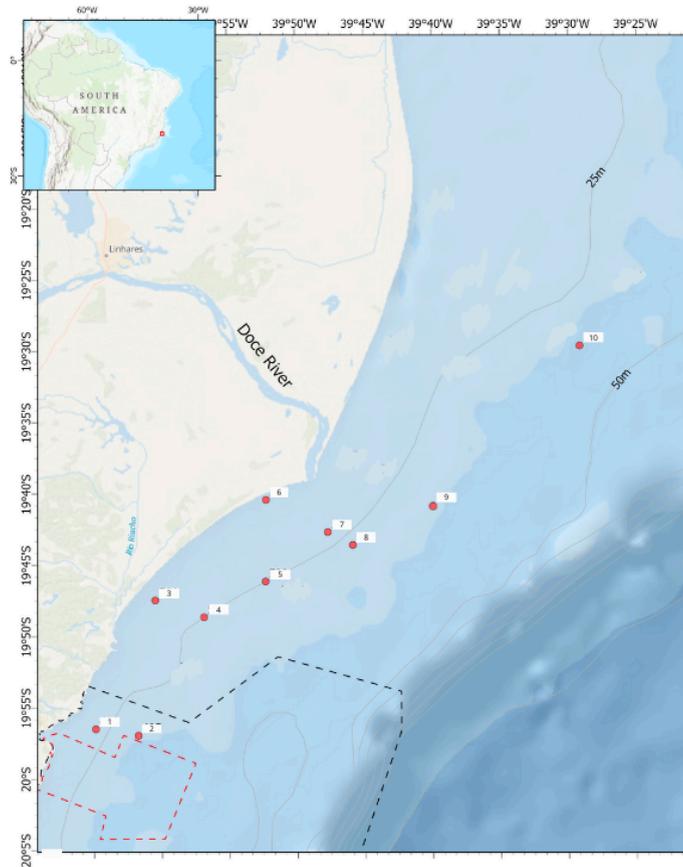


Figura 1: Mapeamento dos pontos de coleta das amostras

As amostras foram preparadas conforme o protocolo descrito por Felix et al. (2023) (Figura 2). Aliquotas de 10g de sedimento, de cada ponto de coleta, foram submetidas a extração com solvente assistida por ultrassom. Cada alíquota foi colocada em um tubo de vidro, adicionando-se 10 mL de metanol. Homogeneizou-se no vórtex, submeteu-se ao banho ultrassônico por 10 min e centrifugou-se a 2500 rpm por 15 min. Esse ciclo foi repetido 3 vezes para cada amostra. Ao término de cada ciclo, o sobrenadante da amostra foi transferido para um balão volumétrico de 250 mL e foi avolumado com água ultrapura, para posterior extração em fase sólida (EFS).

A EFS foi realizada segundo Gomes et al. (2023) (Figura 2). O processo foi realizado em sistema de manifold a vácuo. Foram utilizados dois cartuchos: Strata-SAX (sorvente polimérico à base de estireno-divinilbenzeno com superfície modificada) e o Strata-X (sorvente à base de sílica, 500 mg/6 mL), ambos foram adquiridos da



Phenomenex. Os Strata-SAX foram acoplados à parte superior do Strata-X para a remoção de interferentes da amostra e foram condicionados com 2 x 5 ml de metanol e 2 x 5 mL de água ultrapura. Os 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 3M P.A, da Merck. A percolação das amostras foi realizada sob vácuo, em seguida, o Strata-SAX foi descartado e foi realizado o *clean up* com 10 mL de metanol + água ultrapura (1: 9) para a remoção dos possíveis interferentes no Strata-X.

A eluição dos analitos do cartucho Strata-X foi realizada com 2 x 2 mL de acetona. Os eluatos foram secos até a evaporação completa do solvente. Finalmente, os analitos foram ressolubilizados com 2 mL de etanol para serem submetidos ao ensaio YES (Figura 2).

Os reagentes utilizados no YES foram adquiridos da Sigma-Aldrich (pureza $\geq 98\%$). Para a EFS, hexano, metanol e acetona (grau HPLC) foram fornecidos pela Tedia. A água ultrapura foi obtida de um sistema Milli-Q (Millipore).

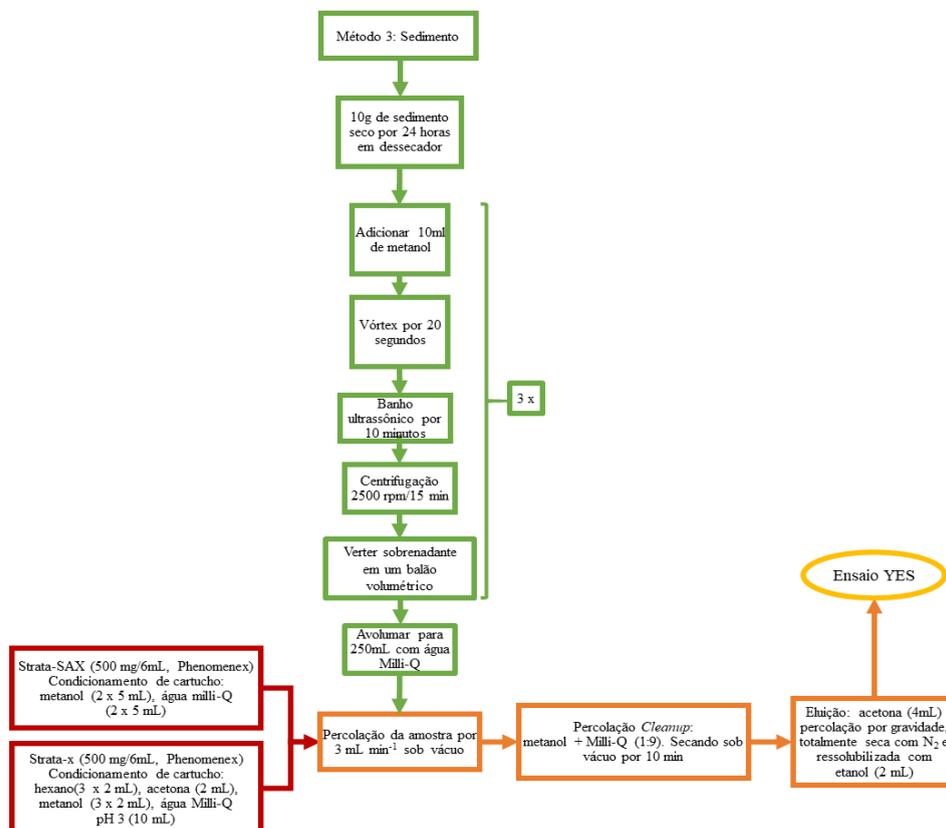


Figura 2: Preparo de amostras de sedimento para o ensaio YES
 Adaptado de Gomes et al. (2023).

Para a análise da atividade estrogênica, utilizou-se o ensaio YES segundo a metodologia de Routledge e Sumpter (1996), com as modificações de Gomes et al. (2023).

As soluções manuseadas no ensaio (meio mínimo, glicose, ácido L-aspártico, L-treonina, sulfato de cobre, vitamina, CPRG, meio de cultivo e meio de análise) foram preparadas também de acordo com a metodologia de Routledge e Sumpter (1996).

Previamente ao ensaio (24 horas), foi realizado o inóculo da levedura, adicionando-se 10 mL de meio de cultivo e 100 μ L do pré-inóculo em um novo frasco de cultivo. Este foi mantido em incubadora de agitação orbital (modelo Q816M20, Quimis) a 28°C e 150 rpm.

Todos os procedimentos do ensaio YES, assim como o procedimento de preparo da levedura, foram realizadas na cabine de segurança biológica classe II A1 (Filterflux® SBIIA1) e com materiais estéreis descartáveis, como (placas, ponteiras, pipetas graduadas, ou esterilizados, como frascos de vidro).

O ensaio YES foi realizado em microplacas de 96 poços, onde cada fileira foi ocupada por uma amostra 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 ng L no poço). As diluições foram feitas em uma placa separada e destinada especificamente para a diluição. O protocolo seguido foi: adicionar 100 μ L de etanol (grau HPLC) em todos os poços de uma fileira, à exceção do primeiro; adicionar ao primeiro poço 200 μ L do extrato da amostra; transferir 100 μ L do primeiro poço para o segundo e homogeneizar com a própria pipeta; transferir 100 μ L do segundo poço para o terceiro e homogeneizar; continuar o procedimento até o último poço, que terá o volume final de 200 μ L.

Feita a diluição, 10 μ L de cada poço foram pipetados e transferidos - em duplicata - para a placa de ensaio, sendo evaporados dentro do fluxo laminar. Este procedimento foi realizado para todas as amostras e o controle positivo (E2). Além disso, como controle negativo, 10 μ L de etanol (grau HPLC) foram adicionados, diretamente na placa de ensaio, alternando com as fileiras de amostras com o objetivo de evitar contaminação (Figura 3).



Figura 3: Exemplo de arranjo das placas do ensaio YES

O controle positivo 17 β -Estradiol, o qual foi utilizado para gerar a curva padrão que serviu de referência comparativa para todo o ensaio, foi preparado através da solução de 17 β -Estradiol (> 98%, Sigma-Aldrich®) na concentração de 54,48 μ g L em etanol (grau HPLC, Tedia®) e a faixa de concentrações da curva de 12 pontos gerada foi de 2724 ng L⁻¹ a 1,33 ng L⁻¹ no poço.

Depois dos 10 μ L transferidos para cada poço da placa de ensaio serem evaporados, restou apenas a massa das substâncias presente nas amostras. Dessa maneira, 200 μ L do meio de análise contendo meio de cultivo,

levedura ($1,35 \times 10^6$ células mL^{-1}) e CPRG (100 mg L^{-1}) foram adicionados em cada poço da placa. Em sequência, as placas de ensaio foram fechadas, lacradas, agitadas por 120 segundos em um agitador de placas (marca IKA®, modelo MS-3) e levadas à estufa (Nova Ética 410) para incubação à 30°C por 72 horas.

Com o período de incubação completo, foi possível observar a mudança de coloração (do amarelo para o vermelho) nos poços das amostras que foram detectados atividade estrogênica. Assim, na etapa final do ensaio YES, foram lidas as absorvâncias 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®).

Os dados foram analisados em termos de absorvância corrigida (equação 1).

$$Abs_{corr(amostra)} = Abs_{575(amostra)} - (Abs_{620(amostra)} - Abs_{620(contrôle\ negativo)}) \quad \text{equação (1)}$$

As curvas de dose-resposta foram traçadas com o software Origin® 6.0 (OriginLab), usando absorvâncias médias corrigidas versus concentrações em escala logarítmica. Curvas padrão do controle positivo E2 e outros compostos orgânicos foram ajustados a uma função logística simétrica. Equivalentes de estradiol (EQ-E2) das amostras ambientais foram obtidos em ng L^{-1} através da interpolação entre a curva dose-resposta do controle E2 e os dados das amostras (equação 2).

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

Nesse caso, A1 e A2 são os valores de absorvância corrigida máxima e mínima da curva de E2 ajustada. O x_0 é a CE50 para E2, em ng L^{-1} . O termo p é a inclinação da curva sigmoidal. O par ordenado (x,y) é 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 (equação 3). Neste trabalho, o FC foi de 5.000 vezes.

$$EQ - E2 = \frac{y \cdot FD}{FC} \quad \text{equação (3)}$$

A citotoxicidade foi avaliada e quantificada através da absorvância a 620 nm (equação 4) conforme proposto por Frische et al. (2009).

$$Citotoxicidade = 1 - \left(\frac{Abs_{620(amostra)}}{Abs_{620(contrôle\ negativo)}} \right) \quad \text{equação (4)}$$

Os valores negativos e nulos foram interpretados como a ausência de citotoxicidade. Já os valores positivos indicaram a inibição ou invisibilização do crescimento da levedura, sendo expressos em porcentagem.

RESULTADOS OBTIDOS

A atividade estrogênica foi quantificada em equivalente estradiol (EQ-E2). A CE50 do controle positivo 17β -estradiol (E2) foi de $36,5 \text{ ng L}^{-1}$ e o limite de detecção de estrogenicidade para o sedimento, considerando o fator de concentração das amostras foi de $0,1 \text{ ng g}^{-1}$ (Figura 4).

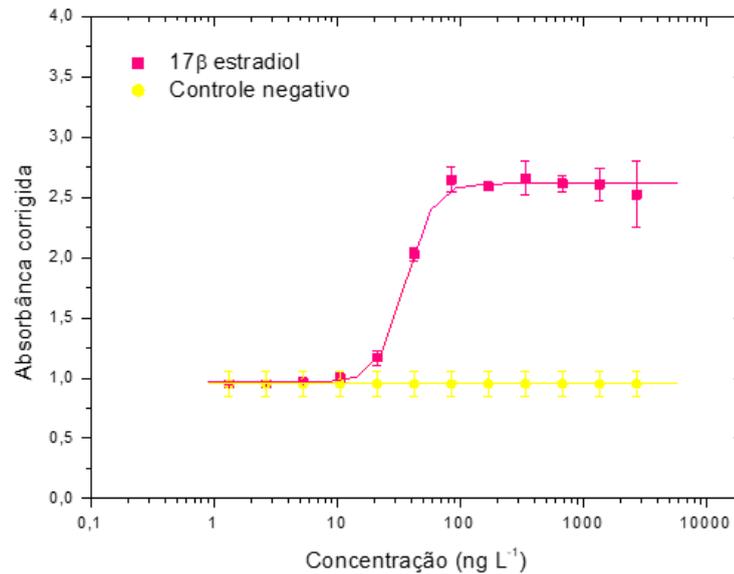


Figura 4: Curva dose-resposta do controle positivo

Os resultados de atividade estrogênica expressos em equivalente estradiol (EQ-E2) variaram de <LD - 12,2 ng g⁻¹ e duas amostras apresentaram citotoxicidade (Tabela 1 e Figura 5).

Tabela 1: Atividade estrogênica expressa em EQ-E2 e citotoxicidade das amostras de sedimento coletadas da plataforma continental adjacente ao Rio Doce.

Amostra	EQ-E2 (ng.g ⁻¹)		Citotoxicidade na diluição (%)
	Média	Desvio	
1	<LD	-	0
2	<LD	-	21
3	0,3	0,01	0
4	<LD	-	0
5	<LD	-	0
6	0,11	0,01	15
7	<LD	-	0
8	<LD	-	0
9	<LD	-	0
10	<LD	-	0

LD=0,1 ng.g⁻¹

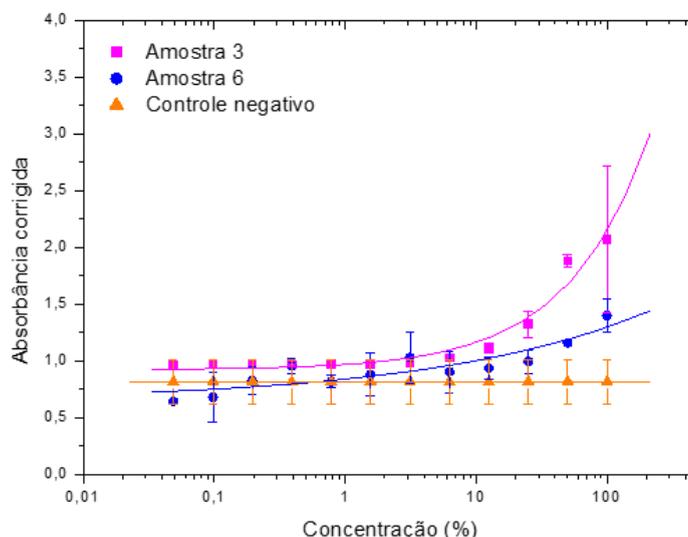


Figura 5: Curvas dose-respostas das amostras que apresentaram atividade estrogênica

ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados do presente estudo apontam a presença de atividade estrogênica em duas amostras de sedimentos coletadas no Rio Doce após o rompimento da barragem de rejeitos do Fundão. Os valores de estrogenicidade encontrados variaram de $<LD - 0,3 \pm 0,01 \text{ ng g}^{-1}$. A amostra de número 6 que apresentou estrogenicidade de $0,11 \text{ ng g}^{-1}$, também demonstrou citotoxicidade de 15%, o que demonstra que a atividade estrogênica encontrada nessa amostra pode ter sido subestimada, uma vez que houve uma redução de 15% do crescimento de células durante o ensaio. Além disso, também foi identificada a presença de 21% de citotoxicidade na amostra 2, impossibilitando, por completo, a identificação da atividade estrogênica nessa amostra.

A citotoxicidade é a inibição ou total inviabilização do crescimento das células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* provocada pela amostra. Com a redução do crescimento da levedura, tem-se uma menor quantidade de receptores disponíveis para os DEs se conectarem e, assim, a atividade estrogênica pode não ser totalmente detectada, subestimando seu resultado. Sendo assim, nas amostras que demonstraram presença de citotoxicidade, não é possível afirmar que o resultado encontrado realmente representa a atividade estrogênica total daquele ponto de coleta.

Os pontos de coleta cujas amostras apresentaram atividade estrogênica se encontram mais próximos da costa litorânea. Tal fato pode acontecer devido à dinâmica do rio que pode favorecer a deposição de contaminantes nestas áreas.

Essa estrogenicidade encontrada pode estar relacionada com os rejeitos da mineração que foram derramados nesse corpo hídrico estudado. Metais como Fe, Zn, Cd e Cu foram encontrados em níveis duas vezes maiores em setores próximos do Rio Doce em comparação aos dados de bioacumulação existentes antes do rompimento da barragem de rejeitos do Fundão (Marques et al., 2022; Vergilio et al., 2021). Vale ressaltar que a concentração destas substâncias continua acima dos limites legais estabelecidos pelas regulamentações brasileiras de solos e águas, expondo a fauna e a comunidade local a riscos de longo prazo que ainda não foram determinados (IGAM, 2020).

De acordo com Denier et al. (2009), o cádmio, o cobre e o zinco são capazes de potencializar a resposta induzida pelo estradiol de uma forma dose-dependente. Desta maneira, estas substâncias podem atuar como potenciais desreguladores endócrinos, modificando a atividade estrogênica dos hormônios endógenos.



Ademais, outros estudos também demonstraram presença de toxicidade nos corpos d'água do Rio Doce. Mendes et al. (2020) relatou toxicidade crônica em microcrustáceos *C. dubia*; Vergilio et al. (2021) apresentou toxicidade nos sedimentos e na água da bacia por meio de ensaios de toxicidade vegetal com *Allium Cepa* e de ensaios de ecotoxicidade com *Raphidocelis subcapitata*, e Yamamoto et al. (2022) apontou deformações e problemas reprodutivos em embriões de *Rhamdia quelen* nos testes de toxicidade com amostras de sedimentos da região.

Os resultados do presente estudo demonstraram que, mesmo depois de dois anos após as águas da bacia hidrográfica do Rio Doce serem contaminadas pela lama química oriunda da barragem do Fundão, há presença de atividade estrogênica nos sedimentos deste corpo d'água. Desta maneira, surge a preocupação sobre este material ter sido, eventualmente, depositado em solos ribeirinhos e nos sedimentos do fundo dos rios, podendo ser absorvido pelos organismos da cadeia alimentar local (Vergilio et al., 2021). Isto ressalta a importância dos bioensaios de detecção de atividade estrogênica e ecotoxicidade no monitoramento do impacto da presença de DEs sobre a biota local e os riscos para os seres humanos.

CONCLUSÕES

Foi detectada a presença de atividade estrogênica e citotoxicidade em amostras de sedimentos provenientes do Rio Doce após o rompimento da barragem do Fundão.

Diante desses resultados, é de extrema importância avaliar os impactos de curto e longo prazo que a lama química pode causar para a biota marinha e as comunidades locais afetadas pelo rompimento da barragem do Fundão. A presença de atividade estrogênica no ambiente pode causar uma série de efeitos adversos na saúde dos seres vivos, como alterações no sistema imunológico, problemas reprodutivos, incluindo um aumento da incidência de câncer, e do ponto de vista animal, até mesmo o declínio de uma população. Portanto, é urgente implementar ações para restaurar o equilíbrio ao longo da bacia hidrográfica do Rio Doce e garantir a saúde e integridade física de todos que dependem deste corpo d'água, incluindo a comunidade local, fauna e flora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Argolo, A.S., Gomes, G., Bila, D.M. (Anti)estrogenic activity impacted by complex environmental matrices: A DOM and multiphase distribution approach. *Chemosphere*, v. 310, 2023.
2. Aquino, S.F., Brandt, E.M.F., Bottrel, S.E.C., Gomes, F.B.R., Silva, S.Q. Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in Brazilian water and the risks they may represent to human health. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, nov. 2021.
3. Bila, D.M., Dezotti, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e consequências. *Quim. Nova*, v. 30, p. 651–666, 2007.
4. Denier X, Hill EM, Rotchell J, Minier C. Estrogenic activity of cadmium, copper and zinc in the yeast estrogen screen. *Toxicol In Vitro*, v.3, p. 569-573, jun. 2009.
5. Felix, L.C.; Argolo, A.S.; Gomes, G.; Santos, A. D.; da Cunha, D. L.; Nascimento, M.; Fonseca, E.; Neto, J.; Bila, D. M. Remoção da citotoxicidade no ensaio de atividade estrogênica (YES) para amostras de sedimento lagunar: Métodos de extração e efeito matriz. *Revista DAE*, v. 71, p. 234-245. 2023.
6. Frische, T., Faust, M., Meyer, W., Backhaus, T. Toxic masking and synergistic modulation of the estrogenic activity of chemical mixtures in a yeast estrogen screen (YES). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, v. 16, p. 593–603, jul. 2009.
7. Gomes, G.; Argolo, A.S.; Felix, L. C.; Bila, D. M. Interferences in the yeast estrogen screen (YES) assay for evaluation of estrogenicity in environmental samples, chemical mixtures, and individual substances. *Toxicology in Vitro*, v. 88, abr. 2023.
8. IGAM, Encarte sobre a qualidade das águas do Rio Doce após 2 anos do rompimento da barragem do Fundão, 2017.
9. Khetan, S. K. *Endocrine Disruptors in the Environment*. Wiley, p. 236, 2014.
10. Lima, A.T., Bastos, F.A., Teubner, F.J. et al. Strengths and Weaknesses of a Hybrid Post-disaster Management Approach: the Doce River (Brazil) Mine-Tailing Dam Burst. *Environmental Management*, v. 65, 2020.



SIMPÓSIO LUSO-BRASILEIRO
DE ENGENHARIA SANITÁRIA
E AMBIENTAL



11. Marques, J. A.; Costa, S. R.; Maraschi, A. C.; Vieira, C. E. D.; Costa, P. G.; de Martinez G. Martins, C.; Santos, H. F.; Souza, M. M.; Sandrini, J. Z.; Bianchini, A. *Biochemical response and metals bioaccumulation in planktonic communities from marine areas impacted by the Fundão mine dam rupture (southeast Brazil)*. *Science of The Total Environment*, v. 806, part 3, 2022.
12. Mendes L.B., de Mello F.A., Chagas K.R., Campelo R.P.M., Medeiros L.C.C., Smith R.E.W., Furley T.H. *Ecotoxicological Assessment of the Doce River Surface Water After the Fundão Dam Collapse*. *Integr Environ Assess Manag*, v. 16, p. 608-614, sep. 2020.
13. Routledge, E.J., Sumpter, J.P. *Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen*. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 15, p. 241–248, 1996.
14. Vergilio, C.; Lacerda, D.; da Souza, T.; de Oliveira, B. C. V.; Fioresi, V. S.; de Souza, V. V.; da R. Rodrigues, G.; de Araujo M. Barbosa, M. K.; Sartori, E.; Rangel, T. P.; de Almeida, D. Q. R.; de Almeida, M. G.; Thompson, F.; de Rezende, C.E. *Immediate and long-term impacts of one of the worst mining tailing dam failure worldwide (Bento Rodrigues, Minas Gerais, Brazil)*. *Science of The Total Environment*, v. 756, 2021.
15. Vilela, C.L.S., Bassin, J.P., Peixoto, R.S. *Water contamination by endocrine disruptors: impacts, microbiological aspects and trends for environmental protection*. *Environmental Pollution*, v. 235, p. 546-559, 2018.
16. WHO (World Health Organization), *Possible developmental early effects of endocrine disruptors on child health*, 2012.
17. Yamamoto, F.; Souza, A., Paula, Paula, V.; Beverari, I.; Garcia, J.; Padial, A.; Abessa, D. *From molecular endpoints to modeling longer-term effects in fish embryos exposed to the elutriate from Doce River*. *Science of The Total Environment*, v. 846, 2022.