

**XII-082 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESTRÔGENICA PELO ENSAIO
YES NAS ÁGUAS SUPERFICIAIS DO MUNICÍPIO DE
SANTA MARIA MADALENA - RJ**

Danieli Lima da Cunha⁽¹⁾

Farmacêutica pelo Centro Universitário Plínio Leite. Mestre em Saúde Pública e Meio Ambiente, com ênfase em Toxicologia Ambiental, pela Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP/FIOCRUZ). Doutoranda em Dinâmica dos Oceanos e da Terra pela Universidade Federal Fluminense (UFF).

Samuel Muylaert⁽²⁾

Engenheiro Ambiental e Especialista em Saúde do Trabalhador pela Universidade Federal Fluminense (UFF).

Daniele Maia Bila⁽³⁾

Engenheira Química pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Mestre, Doutora em Engenharia Química pela COPPE/UFRJ. Prof. Adjunto no Depto. de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente da FEN/UERJ.

Jaime Lopes da Mota Oliveira⁽⁴⁾

Biólogo pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Mestre e Doutor em Ciências com ênfase em Microbiologia Ambiental pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Ariane Leites Larentis⁽⁵⁾

Engenharia Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Mestre e Doutora em Engenharia Química pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Endereço⁽¹⁾: Rua General Andrade Neves, 02 - São Domingos - Niterói - RJ - CEP: 24210-000 - Brasil - Tel: (21) 99174-9661 - e-mail: danielicunha@hotmail.com

RESUMO

Uma série de compostos químicos têm sido classificados como desreguladores endócrinos, tais como pesticidas, produtos químicos empregados e produzidos por indústrias e estrogênios naturais e sintéticos. A presença destes compostos em matrizes aquáticas tem gerado cada vez mais preocupação na comunidade científica, em virtude da sua atividade estrogênica e, consequentemente, dos seus potenciais efeitos adversos à biota. Neste trabalho, utilizou-se o ensaio *in vitro* YES (*Yeast Estrogen Screen*) para a determinação da atividade estrogênica em águas superficiais do município de Santa Maria Madalena - RJ. Observou-se atividade estrogênica (com resposta altamente e moderadamente estrogênica) nas amostras do corpo hídrico que recebe maior carga orgânica de efluentes domésticos. Isso pode estar associado ao fato de ser uma área de contribuição maior adensada e contar com uma menor cobertura de saneamento (rede coletora e estação de tratamento de esgotos).

PALAVRAS-CHAVE: Desreguladores Endócrinos, Ensaio YES, Águas Superficiais.

INTRODUÇÃO

Em virtude de seus potenciais efeitos adversos à saúde de várias espécies, a ocorrência em matrizes aquáticas de compostos químicos classificados como desreguladores endócrinos tem gerado cada vez mais preocupação na comunidade científica. A exposição a tais substâncias tem sido associada a alterações bioquímicas, histopatológicas, no processo reprodutivo e no desenvolvimento de organismos aquáticos.

Para a determinação da presença de desreguladores endócrinos na água podem ser utilizadas diferentes metodologias. Como exemplo têm-se os ensaios *in vitro* utilizados para determinar o potencial estrogênico de amostras ambientais, com base em mecanismos de ação específicos dos desreguladores endócrinos (BILA, 2005). Um dos principais ensaios *in vitro* utilizados para determinação da atividade estrogênica é o ensaio YES (*Yeast Estrogen Screen*), um método desenvolvido por Routledge e Sumpter que utiliza a levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada. Este ensaio vem sendo largamente empregado devido à rapidez, à reprodutibilidade e à sensibilidade (LI et al., 2014; SILVA et al., 2002; BERESFORD et al., 2000; PAYNE et al., 2000).

O objetivo deste estudo foi determinar pelo do ensaio *in vitro* YES, a presença de compostos com potencial de interferir no sistema endócrino de organismos nos corpos hídricos do município de Santa Maria Madalena - RJ.

MATERIAIS E MÉTODOS

AMOSTRAGEM

A coleta das amostras de água superficial foi realizada nos principais corpos hídricos que drenam a área urbana do município de Santa Maria Madalena (Córrego São Domingos e Ribeirão do Santíssimo) e realizada em dois períodos diferentes: na primeira quinzena de setembro 2013 (final da estiagem) e na segunda quinzena de outubro 2013 (início do período chuvoso). O ponto de amostragem de cada corpo hídrico foi escolhido em um trecho a jusante de todas as contribuições da área de drenagem analisada. O Quadro 1 apresenta a descrição dos pontos de coleta e as coordenadas de localização.

Quadro 1: Posicionamento dos pontos de coleta nos corpos hídricos amostrados.

CORPO HÍDRICO	PONTOS	DESCRIÇÃO	LOCALIZAÇÃO
São Domingos	SD	Exutório da área de estudo	21°56'29,8" S 42°00'16,1" O
Ribeirão do Santíssimo	RS		21°58'03,1" S 41°59'39,3" O

Para caracterizar melhor os cursos d'água foi realizada uma amostragem do tipo composta, que consiste na combinação de amostras individuais de água (com o mesmo volume), tomadas em intervalos de tempo programados. Para este estudo foram estabelecidos três momentos de coleta: 8:00 às 9:00, 12:00 às 13:00 e 17:00 às 18:00. Este tipo de amostragem contribui para minimizar os efeitos da variabilidade das concentrações ao longo do tempo, dando uma ideia da concentração média (VON SPERLING, 2012).

Para cada ponto amostrado, ao final do dia, foram coletados dois frascos de 1 litro de água (amostra em duplicata). As amostras ambientais foram identificadas e armazenadas em frascos de vidro âmbar previamente descontaminados e com adição de 10 mL.L⁻¹ de metanol para impedir a biodegradação dos analitos de interesse. As mesmas também foram acondicionadas em isopor com gelo, transportadas e posteriormente armazenadas a 4 °C no laboratório para a realização das análises.

PREPARO DAS AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESTROGÊNICA PELO ENSAIO YES

As amostras foram primeiramente filtradas com auxílio de uma bomba de vácuo e, na sequência ajustou-se o pH da amostra para $2,00 \pm 0,20$ com adição de uma solução de ácido clorídrico 30% v/v. Em seguida, foi realizada a extração em fase sólida (EFS).

Ainda com o auxílio de uma bomba de vácuo e um *manifold*, o procedimento da EFS foi iniciado pelo condicionamento do cartucho com a passagem dos seguintes solventes: 5 mL de acetato de etila, 5 mL de metanol e 5 mL de água ultrapura. Após esta etapa, 500 mL da amostra foram passados pelo cartucho. Em seguida, os cartuchos foram submetidos ao *clean-up* (limpeza), onde foi percolado duas vezes o volume de 5 mL de água ultrapura com pH 2. Por fim, a última etapa consistiu na eluição, onde foram percolados 4 mL de acetona. Os eluatos foram recolhidos em frascos âmbar de 20 mL e submetidos à secagem por um fluxo de nitrogênio, e posteriormente os frascos âmbar foram reconstituídos com 2 mL de etanol.

PROCEDIMENTO DE ANÁLISE DO ENSAIO YES

A metodologia utilizada para a determinação da atividade estrogênica pelo ensaio YES foi baseada segundo Routledge e Sumpter (1996). As análises foram realizadas em microplacas de 96 poços e preparadas em uma capela de fluxo laminar.

Para obtenção da curva padrão de 17 β -estradiol foi preparada uma diluição em série utilizando a solução estoque de 17 β -estradiol (54,48 $\mu\text{g.L}^{-1}$) em etanol absoluto na faixa de 54,48 $\mu\text{g.L}^{-1}$ a 26,61 ng.L⁻¹. Após a diluição serial em uma placa à parte, alíquotas de 10 μL das amostras reconstituídas em etanol foram adicionados em cada poço das linhas A e C (em duplicata) da microplaca (Figura 1). Após esta adição, as amostras foram deixadas em repouso para que o conteúdo dos poços fosse totalmente evaporado. Passado o tempo de secagem do solvente, um volume de 200 μL de meio de análise (meio de crescimento, levedura e CPRG (substrato cromogênico)) foi adicionado em cada poço. A microplaca foi então selada com fita crepe, agitada vigorosamente por 5 minutos em um agitador de placas e incubada por três dias a 30 °C em uma estufa. Após a incubação, a microplaca foi agitada e permaneceu em repouso por um período de 1 hora.

Os resultados de atividade estrogênica são mensurados por meio da mudança de coloração do substrato de amarelo (sem estrogenicidade) para rosa (com estrogenicidade). Para quantificar este efeito, a absorbância dos poços foi medida a 540 nm e a 650 nm, através de espectrofotometria.

Para as amostras ambientais foi seguido o mesmo procedimento. As placas com 8 linhas (identificadas de A a H) foram preparadas com o seguinte arranjo: A e C em duplicata do frasco 1 do ponto de amostragem, E e G em duplicata do frasco 2 do ponto de amostragem e as demais linhas com etanol absoluto (branco).

RESULTADOS

PADRÃO

O 17 β -estradiol é considerado um padrão dos ensaios de atividade estrogênica, sendo assim, é usado como controle positivo no ensaio YES para demonstrar a resposta estrogênica. A Figura 1 apresenta a microplaca do ensaio YES do padrão do 17 β -estradiol e sua respectiva curva dose-resposta.

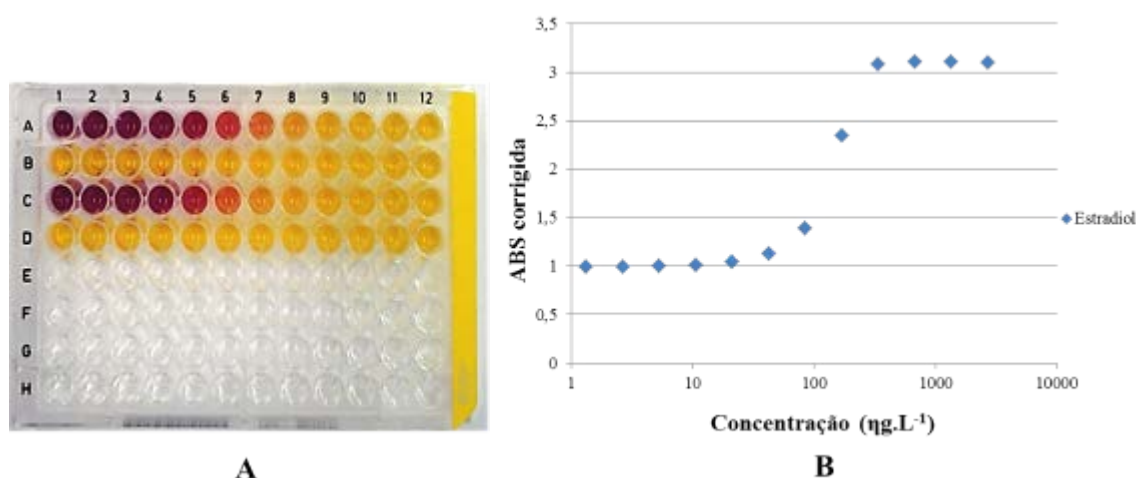


Figura 1: A) Microplaca do ensaio YES do 17 β -estradiol (fileiras A e C) e branco (fileiras B e D). B) Curva dose-resposta padrão do controle positivo 17 β -estradiol.

RESULTADOS DA PRIMEIRA CAMPANHA

O ponto SD 2 apresentou uma alta atividade estrogênica, como mostra a Figura 2. O resultado do ponto SD 1 foi desconsiderado uma vez que a amostra foi perdida devido a um erro laboratorial. Já o ponto RS (1 e 2) não exibiu resposta estrogênica nas condições do ensaio YES (Figura 3). Os índices 1 e 2 representam amostras em duplicata, ou seja, são representativas do mesmo ponto.

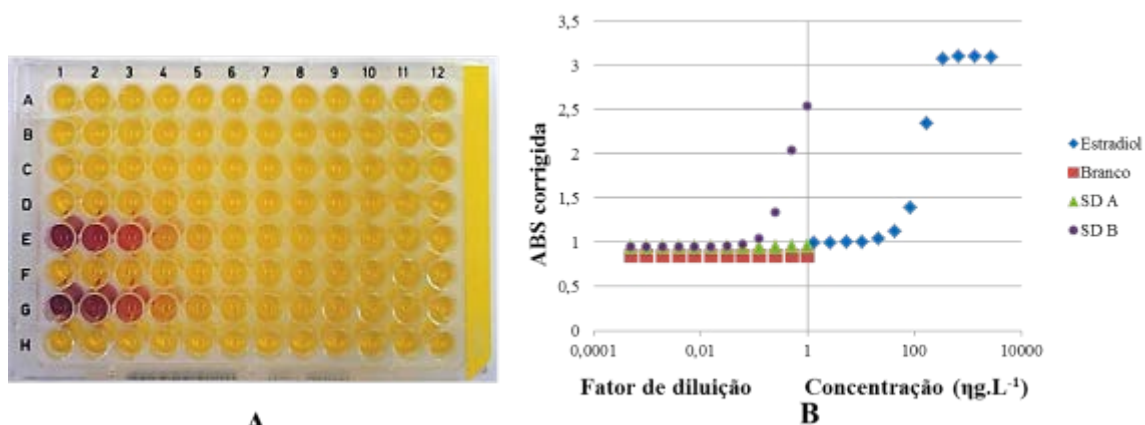


Figura 2: A) Microplaca do ensaio YES das amostras SD 1 (fileiras A e C) e branco (fileiras B e D) e SD 2 (fileiras E e G) e branco (fileiras F e H). B) Curvas dose-resposta do 17 β -estradiol e das amostras no SD 1 e 2.

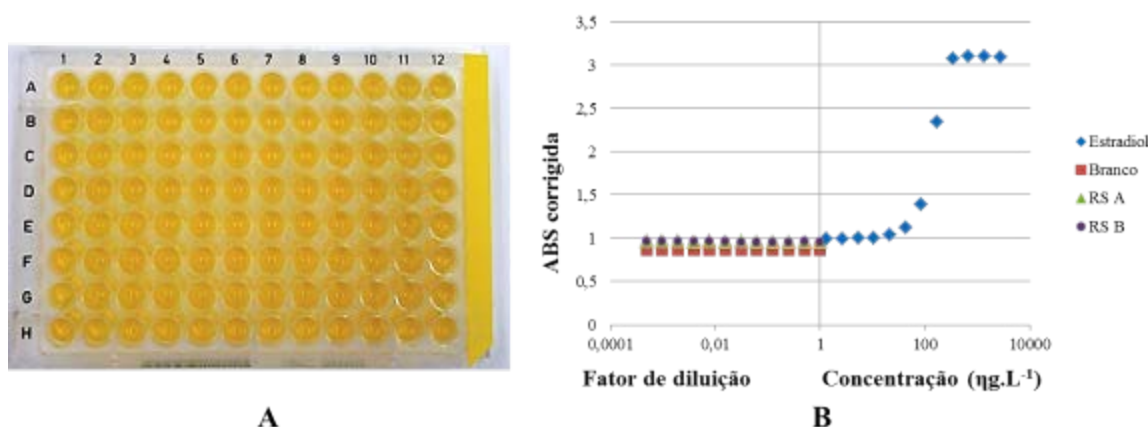


Figura 3: A) Microplaca do ensaio YES das amostras RS 1 (fileiras A e C) e branco (fileiras B e D) e RS 2 (fileiras E e G) e branco (fileiras F e H). B) Curvas dose-resposta do 17 β -estradiol e das amostras no RS 1 e 2.

RESULTADOS DA SEGUNDA CAMPANHA

O ponto SD (1 e 2) apresentou uma resposta estrogênica moderada no ensaio YES. Já o ponto RS (1 e 2) não apresentou uma resposta estrogênica. As Figuras 4 e 3 apresentam as microplacas do ensaio YES destes pontos amostrados com suas respectivas curvas dose-resposta dos pontos coletados.

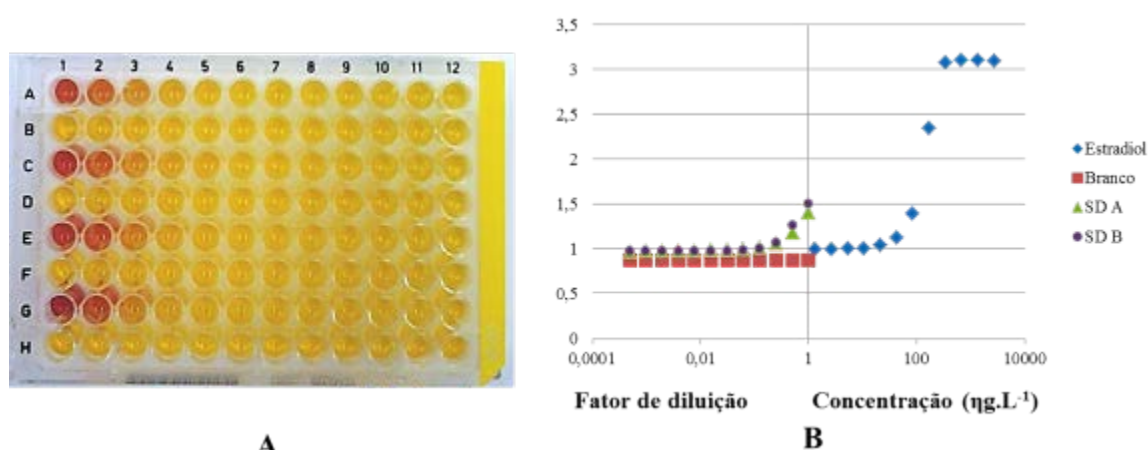


Figura 4: A) Microplaca do ensaio YES das amostras SD 1 (fileiras A e C) e branco (fileiras B e D) e SD 2 (fileiras E e G) e branco (fileiras F e H). B) Curvas dose-resposta do 17β-estradiol e das amostras no SD 1 e 2.

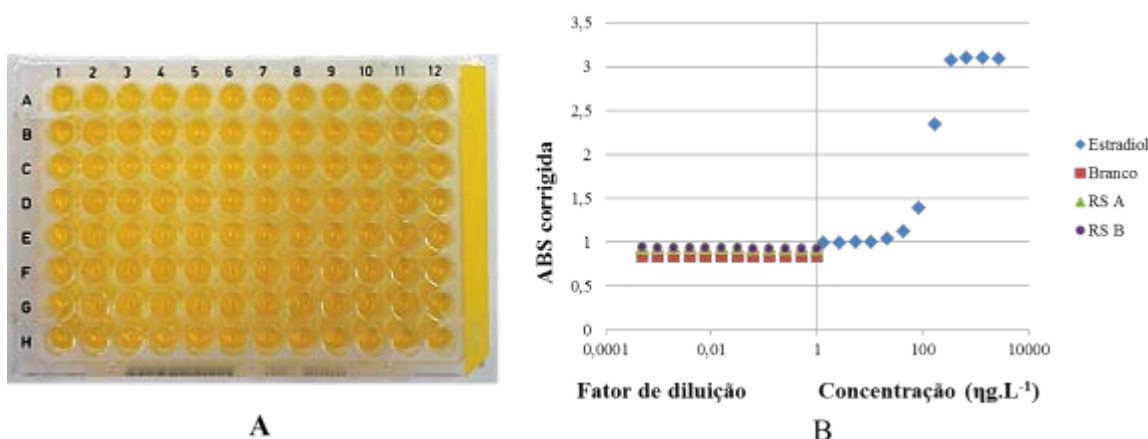


Figura 5: A) Microplaca do ensaio YES das amostras RS 1 (fileiras A e C) e branco (fileiras B e D) e RS 2 (fileiras E e G) e branco (fileiras F e H). B) Curvas dose-resposta do 17β-estradiol e das amostras no RS 1 e 2.

Com base nos resultados das amostras coletadas, observou-se atividade estrogênica nas amostras SD, com respostas altamente e moderadamente estrogênica. Este resultado pode ser explicado pelo fato de o córrego São Domingos receber efluentes domésticos de uma área com maior concentração de casas (4 bairros, inclusive o centro). Este corpo hídrico apresentou maior atividade estrogênica na primeira campanha, o que pode ser explicado já que no mês de setembro (primeira campanha) o corpo hídrico ainda apresentava uma baixa vazão comparada ao final do mês de outubro (segunda campanha), sendo, portanto mais fácil determinar os contaminantes ambientais, pois estes estão menos diluídos.

Com relação ao Ribeirão do Santíssimo, a não observação de resposta estrogênica pode estar associada ao fato de sua área de contribuição ser menos adensada e contar com uma maior cobertura de saneamento (rede coletora e estação de tratamento de esgotos).

CONCLUSÕES

O ensaio YES forneceu bons resultados para a identificação da atividade estrogênica em amostras de águas superficiais com contribuição de efluentes domésticos, sendo um primeiro e importante indicativo de possíveis riscos a biota aquática.

Para trabalhos futuros, permanece a expectativa de se avançar nas pesquisas sobre esta área de estudo, com a utilização de metodologias analíticas (como por exemplo, cromatografia) com a finalidade de detectar os compostos presentes nestas amostras ambientais, que apresentaram atividade estrogênica. Com este esforço, será possível estimar o nível de contaminação no qual se encontram as águas superficiais da área urbana do município de Santa Maria Madalena e os possíveis efeitos ecotoxicológicos decorrentes desta contaminação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERESFORD, N.; ROUTLEDGE, E. J.; HARRIS, C. A.; SUMPTER, J. P. Issues arising when interpreting results from an in vitro assay for estrogenic activity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 162, p. 22-33, 2000.
2. BILA, D. M. Degradação e Remoção da Atividade Estrogênica do Desregulador Endócrino 17 β -estradiol pelo Processo de Ozonização. Tese de Doutorado em Ciências em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2005.
3. LI, B.; CAO, J.; XING, C.; WANG, Z.; CUI, L. Assessing estrogenic activity and reproductive toxicity of organic extracts in WWTP effluents. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 39 n. 2, p. 942-952, 2014.
4. PAYNE, J. P.; RAJAPAKSE, N. A.; WILKINS, M.; KORTENKAMP, A. Prediction and assessment of the effects of mixtures of four xenoestrogens. *Environmental Health Perspectives*, v. 108, p. 983-987, 2000.
5. ROUTLEDGE, E. J.; SUMPTER, J. P. Estrogenic Activity of Surfactants and Some of their Degradation Products Assessed Using a Recombinant Yeast Screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 15, n. 3, p. 241-248, 1996.
6. SILVA, E.; RAJAPAKSE, N.; KORTENKAMP, A. Something from Nothing – Eight Weak Estrogenic Chemicals Combined at Concentrations below NOECs Produce Significant Mixture Effects. *Environmental Science and Technology*, v. 36, p. 1751-1756, 2002.
7. VON SPERLING, V. M. Estudos e modelagem da qualidade da água de rios. *Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias. DESA*, v. 7, 588 p. 2012.