

II-226 – ATIVIDADE ESTROGÊNICA EM MATRIZ AMBIENTAL: CONTRIBUIÇÃO DOS SÓLIDOS SUSPENSOS TOTAIS

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 (DESM/UERJ).

Allan dos Santos Argolo⁽¹⁾

Engenheiro Civil pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Mestrando do Programa de Engenharia Ambiental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (PEAMB/UERJ).

Caroline Letieri Baptista⁽¹⁾

Graduanda em Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

João Victor Moreth⁽¹⁾

Graduando em Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Giselle Gomes⁽¹⁾

Bióloga pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Mestre em Engenharia Ambiental pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro e doutoranda do Doutorado em Engenharia Ambiental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (DEAMB/UERJ).

Endereço⁽¹⁾: Rua São Francisco Xavier 524, 5029-F., Maracanã - Rio de Janeiro - Cep: 20550-900 – Brasil. - e-mail: danielbilauerj@gmail.com

RESUMO

Desreguladores endócrinos (DE) são micropoluentes que em baixas concentrações apresentam efeitos adversos a seres humanos e animais. Estes compostos podem ser encontrados em águas superficiais, efluentes e outras matrizes ambientais. Certas propriedades, como solubilidade e coeficientes de partição indicam que os DE's estrogênicos têm afinidade com partículas sólidas orgânicas e sugerem um fracionamento entre fases dissolvida e particulada de uma matriz ambiental líquida. Neste trabalho foi avaliada a atividade estrogênica de amostras do rio Maracanã através do ensaio *in vitro* YES (*Yeast Estrogen screen*). Foi considerando o fracionamento das substâncias entre as fases e duas faixas de diâmetro de sólidos suspensos. Foram encontrados valores de equivalente estradiol total na faixa de 35 ng L⁻¹ a 65 ng L⁻¹, dos quais 35% a 62% estavam associados aos sólidos suspensos da amostra. A maior parte da estrogenicidade esteve associada às partículas menores que 0,70 µm e foi observada a citotoxicidade associada aos extratos das partículas maiores que 0,70 µm. Os resultados demonstram a importância do controle de sólidos suspensos finos no tratamento de efluentes para o controle de desreguladores endócrinos no meio.

PALAVRAS-CHAVE: Desreguladores endócrinos, Partição, Sólidos suspensos, Atividade Estrogênica, Ensaio *in vitro* YES.

INTRODUÇÃO

Desreguladores endócrinos (DE) são uma classe de micropoluentes, isto é, poluentes encontrados no meio ambiente em concentrações da ordem de µg L⁻¹ e ng L⁻¹, que podem causar efeito adverso no sistema endócrino dos seres vivos. Na classe dos DE, que inclui substâncias naturais e sintéticas, destacam-se aquelas que têm atividade estrogênica, sendo capazes de se ligar ao receptor de estrogênio e eliciar uma resposta (BILA, 2005).

Tais poluentes são encontrados no meio ambiente em suas mais variadas matrizes, o que decorre das diferentes fontes de poluição e das propriedades físico-químicas das substâncias. São reportados DE em águas superficiais e subterrâneas, em sedimentos marinhos e de corpos hídricos, em esgotos e efluentes industriais, em efluentes e lodos biológicos das ETE, no solo, em lixiviados de aterros sanitários e, eventualmente, em água potável, o que compromete a qualidade das águas, a saúde dos ecossistemas e, potencialmente, o próprio suprimento de água potável (AQUINO *et al.*, 2013; BILA e DEZOTTI, 2007).

As principais vias de entrada desses contaminantes no meio – efluentes, *run-off* de agricultura (escoamento superficial) e lixiviados – constituem descargas químicas contínuas. Além disso, a relativamente alta lipofilicidade e persistência dos DE possibilitam sua bioacumulação e biomagnificação no meio, o que induz a um problema de desregulação endócrina mais globalizado (VEGA-MORALES *et al.*, 2013). Com relação às águas superficiais, com frequência é reportada a presença de substâncias estrogênicas (estrogênios naturais ou sintéticos), cuja principal origem é a contínua e diária excreção nos esgotos sanitários.

A ação dos DE, seu comportamento e seu destino no meio estão diretamente relacionados às suas propriedades físico-químicas. Propriedades como a solubilidade em água e os coeficientes de partição ($\log K_{ow}$ e $\log K_{oc}$) indicam maior afinidade com partículas sólidas e orgânicas e sugerem um inerente mecanismo de fracionamento entre as fases dissolvida e particulada das matrizes ambientais aquosas. Este conhecimento é fundamental para a avaliação do risco associado ao lançamento de efluentes e para a aplicação de tecnologias de tratamento de efluentes com vistas ao controle desses poluentes no meio.

A maioria das substâncias estrogênicas tem sido avaliada apenas na fase aquosa dissolvida, com a premissa de que a maior fração se encontra nessa fase (WILLIAMS, 1999). Contudo, considerando a relativamente alta lipofilicidade e baixa volatilidade destes compostos, a adsorção à fase sólida da matriz mostra-se como um processo relevante que não deve ser negligenciado (BIRKETT e LESTER, 2003; DAGNINO *et al.*, 2010; YARAHMADI *et al.*, 2018).

Portanto, este trabalho teve como objetivo determinar a atividade estrogênica de amostras de água superficial através do ensaio *in vitro* YES, considerando o fracionamento das substâncias estrogênicas nas fases líquida (sólidos dissolvidos) e particulada (sólidos suspensos).

MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de água superficial foram coletadas em um ponto do rio Maracanã, localizado na região norte da cidade do Rio de Janeiro. Ao todo foram realizadas duas campanhas de coleta, em maio e julho de 2018.

O material foi coletado em frascos de vidro âmbar previamente descontaminados e transportado para o Laboratório de Engenharia Sanitária (LES/UERJ). Em seguida, foi homogeneizado e separado em volumes de 1L em novos frascos de vidro âmbar descontaminados.

Cada volume (1L) separado foi identificado como uma amostra, totalizando-se 4 amostras na primeira campanha de coleta e 2 amostras na segunda campanha (Tabela 1). Todas as amostras foram acidificadas a pH 2,0 com ácido clorídrico (HCL) 3M e armazenadas em refrigerador, para a sequência do preparo com filtração e extração dentro de até 48h.

Tabela 1: Identificação das amostras

Amostra	Identificação	Data da coleta
1	1ª coleta	17/05/18
2	1ª coleta	
3	2ª coleta	09/07/18
4	2ª coleta	
5	1ª coleta com adição de estrogênios	17/05/18
6	1ª coleta com adição de estrogênios	

Para garantir que as amostras apresentassem atividade estrogênica acima do limite de detecção do ensaio e o efeito investigado no estudo pudesse ser analisado, foram adicionados 20 μL de uma solução de mistura de estrogênios em duas amostras (5 e 6) da primeira campanha. A solução consistiu da mistura dos estrogênios 17 β -estradiol (E2), 17 α -etinilestradiol (EE2) e estriol (E3), cada um na concentração de 1 mg L^{-1} . Isto resultou numa concentração final de 20 ng L^{-1} na amostra.

Paralelamente, em cada coleta foi separado 1L de amostra em frasco de polietileno para caracterização físico-química. Foram avaliados os parâmetros sólidos suspensos totais (SST), turbidez, carbono orgânico dissolvido (COD) e demanda química de oxigênio (DQO), segundo os métodos descritos em APHA (2012) (Tabela 2).

Tabela 2: Metodologia de análise dos parâmetros físico-químicos

Parâmetro	Método APHA, 2012
Turbidez (UNT)	2130 B
SST (mg L ⁻¹)	2540 D
DQO (mg O ₂ L ⁻¹)	5220 D
COD (mg L ⁻¹)	5310 B

O preparo de amostras para realização dos ensaios de atividade estrogênica consistiu das seguintes etapas em sequência:

- (i) Filtração das amostras em membrana de fibra de vidro (~0,70 µm, Millipore) e, em seguida, de nylon (0,45 µm, Millipore). Assim, duas faixas de diâmetro de sólidos suspensos foram obtidas;
- (ii) Extração sólido-líquido com metanol assistida por ultrassom dos sólidos suspensos retidos nas membranas;
- (iii) Extração em fase sólida (EFS) das amostras filtradas e dos extratos das membranas (sólidos suspensos), com cartucho Strata-X (Phenomenex). O condicionamento foi procedido com 6 mL de hexano, 2 mL de acetona, 6 mL de metanol (grau HPLC, Tedia) e 10 mL de água ultrapura com pH ajustado para 3,0, com HCl 3M (grau P.A., Merck). Após percolação de amostras, foi realizado clean up com 10 mL de solução de metanol e água ultrapura (1:9) e secagem dos cartuchos;
- (iv) Eluição do cartucho com 4mL de acetona, secagem em fluxo de N₂ e reconstituição com 2 mL de etanol.

Portanto, cada amostra foi avaliada em três frações: a fração líquida (dissolvida), a fração de sólidos suspensos com diâmetro superior a 0,70 µm e a fração de sólidos suspensos com diâmetro entre 0,45 µm e 0,70 µm.

A análise de atividade estrogênica foi realizada por meio do ensaio *in vitro* YES (*Yeast Estrogen Screen*) com a levedura geneticamente modificada *Saccharomyces cerevisiae*, segundo adaptação da metodologia descrita em Routledge e Sumpter (1996).

O ensaio baseia-se na expressão, em presença de amostra com potencial atividade estrogênica, de um receptor de estrogênio humano (hER) contido na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O processo resulta na liberação da enzima β-galactosidase que, no meio de análise, degrada o substrato cromogênico *chlorophenol red-β-D-galactopyranoside* – CPRG (que possui coloração amarela) em *chlorophenol red* – CPR (que possui coloração avermelhada). Trata-se, portanto, de um ensaio com resposta colorimétrica, avaliada por espectrofotometria.

O ensaio é realizado em microplacas de 96 poços com diluição seriada dos extratos das amostras em etanol e do 17β-estradiol (E2) como controle positivo e curva de calibração, na faixa de 2724 a 1,33 ng L⁻¹. Além disso, o etanol é utilizado como controle negativo (branco). Numa placa de ensaio, 10 µL de cada diluição são transferidos e deixados evaporar para, em seguida, serem adicionados 200 µL de meio de cultivo contendo levedura e CPRG.

Após incubação de 72 horas à 30°C, medem-se as absorbâncias a 575 nm e 620 nm para avaliar cor e turbidez, respectivamente, e proceder os cálculos. Interpolando os dados da curva da amostra com a curva dose-resposta do E2, são obtidos os resultados de equivalente estradiol (EQ-E2) em ng L⁻¹.

Foram utilizadas curvas padrão de E2 com concentração de efeito mediano (CE50) de 56,58 e 44,36 ng L⁻¹ para cada ensaio, respectivamente. O ensaio teve os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) iguais a 12 ± 2 ng L⁻¹ e 35 ± 11 ng L⁻¹, respectivamente, os quais são ainda multiplicados pelo fator de concentração das amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros físico-químicos obtidos para a caracterização do rio Maracanã nas duas campanhas de coleta são apresentados na Tabela 3. De modo geral, as informações indicam o visível nível de degradação do rio.

Tabela 3: Parâmetros físico-químicos das águas do rio Maracanã

Coleta	SST (mg L ⁻¹)		Turbidez (UNT)	DQO (mg L ⁻¹)	COD (mg L ⁻¹)
	Ø > 0,70 µm	0,45 < Ø < 0,70 µm			
17/05/18	78,0	9,9	65	51,8	27,7
09/07/18	95,0	3,3	80	54,32	45,82

Entre as duas amostras, foi observado o aumento da turbidez (de 65 para 80 UNT) e do COD (de 27,7 para 45,82 mg L⁻¹). Com relação aos SST, foi observado um aumento de 87,9 para 98,3 mg L⁻¹, mas houve uma redução dos sólidos com diâmetro na faixa de 0,45 a 0,70 µm. Comparativamente, Yarahmadi *et al.* (2018) reportaram afluentes de ETE com SST de até 67,9 e 110 mg L⁻¹, utilizando membranas de 0,45 µm e 0,30 µm, respectivamente, e com COD de até 19 mg.L⁻¹.

Poucos estudos têm avaliado a ocorrência de substâncias estrogênicas em matrizes ambientais aquosas considerando seu fracionamento entre as fases dissolvida e particulada. Contudo, algumas propriedades físico-químicas desses compostos, como solubilidade, log *k_{ow}*, log *k_{oc}* e massa molecular, levam a crer que seu comportamento no meio pode variar, a depender das características da matriz em questão. No presente estudo, foi evidente a contribuição da fase particulada na quantificação da atividade estrogênica total, o que vai ao encontro da previsão teórica.

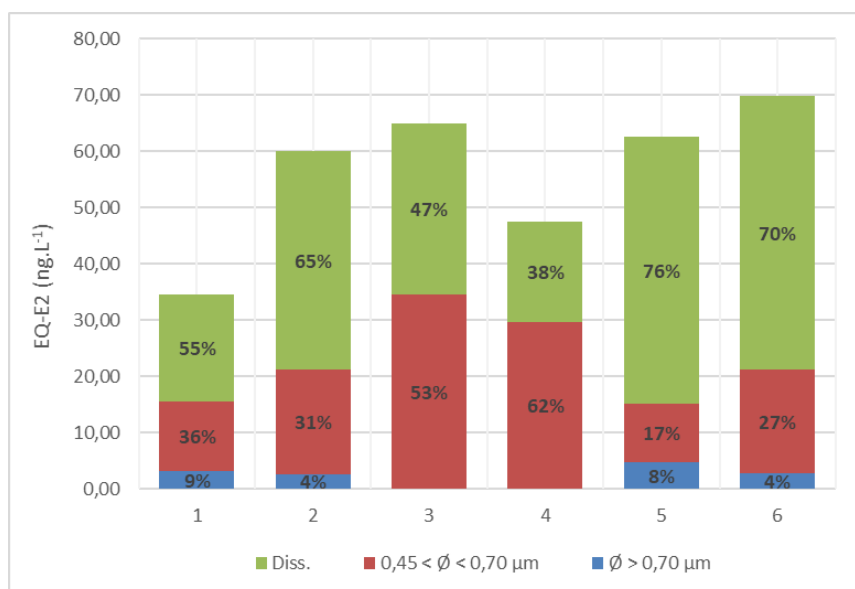
A Tabela 4 e a Figura 1 mostram os resultados para as amostras de água superficial analisadas. Foram obtidos valores de EQ-E2 total na faixa de 35 a 65 ng L⁻¹. O ensaio YES mostrou também que de 35% a 62% da atividade estrogênica total das amostras estava associada a parcela dos sólidos suspensos.

Tabela 4: Valores de EQ-E2 (em ng L⁻¹ e porcentagem) total e de cada fração das amostras analisadas

Amostra	EQ-E2 (ng L ⁻¹ ; %)							
	Ø > 0,70 µm		0,45 < Ø < 0,70 µm		Diss.		Total	
1	3,12	9%	12	36%	19	55%	35	100%
2	2,50	4%	19	31%	39	65%	60	100%
3	< LD	0%	35	53%	30	47%	65	100%
4	< LD	0%	30	62%	18	38%	47	100%
5	4,76	8%	10	17%	48	76%	63	100%
6	2,71	4%	18	27%	49	70%	70	100%

LD: Limite de Detecção do ensaio *in vitro* YES.

Figura 1: Valores percentuais dos EQ-E2 associados a cada fração analisada das águas do rio Maracanã.



Substâncias adsorvidas às partículas com diâmetro superior a 0,70 μm foram responsáveis apenas por 0% a 9% da atividade estrogênica total. Em contraponto, substâncias adsorvidas às partículas com diâmetro entre 0,45 μm e 0,7 μm foram responsáveis por 31% a 62% da atividade estrogênica total.

Tal observação está em acordo com o conhecimento estabelecido sobre o mecanismo da sorção, uma vez que a capacidade de adsorção das partículas, que é proporcional à área superficial específica. Deste modo, partículas com pequenos diâmetros têm maior área superficial disponível para adsorção (DUONG *et al.*, 2010; SANGSTER, *et al.*, 2015; QI *et al.*, 2014).

No estudo foi realizada a dopagem da amostra (amostra 5 e 6) com adição de estrogênios, no intuito de garantir a presença de substâncias estrogênicas e observar o seu comportamento junto ao material particulado presente na matriz ambiental. Tanto amostras dopadas como não dopadas apresentaram atividade estrogênica e foi observado comportamento semelhante quanto à contribuição de cada faixa de diâmetro de partículas para a adsorção de substâncias estrogênicas.

Contudo, amostras dopadas apresentaram percentuais mais altos de atividade estrogênica associada a fase dissolvida (70% e 76%). Uma hipótese é que o tempo de contato no laboratório foi insuficiente para a completa adsorção dos estrogênios adicionados aos sólidos suspensos (Duong *et al.*, 2010).

Os resultados demonstraram a importância da análise das frações sólidas para a quantificação da atividade estrogênica total de matrizes ambientais aquosas, tal como reportado por alguns poucos autores. Apenas Dagnino *et al.* (2010) avaliaram efetivamente a atividade estrogênica das fases dissolvida e particulada de afluentes e efluentes de ETE na França por meio de ensaio com receptor de estrogênio repórter (ER α) e utilizando membrana de 1,2 μm para separação de sólidos suspensos.

As porcentagens de contribuição da fase particulada encontradas por Dagnino *et al.* (2010) variaram de 2,6% a 67,4% para afluentes e de 3,4% a 80% para efluentes, o que está relacionado à variação dos SST nas diferentes tecnologias de ETE avaliadas e ao diâmetro dos sólidos analisados.

Por outro lado, Yarahmadi *et al.* (2018) determinaram, por cromatografia líquida com espectrometria de massa, a concentração de esteroides (estrogênios, progesteronas e testosterona) nas fases dissolvida e particulada de afluentes e efluentes de ETE no Canadá, utilizando uma membrana de 0,30 μm para separação dos sólidos suspensos.

Foram reportados percentuais de concentração associados a fase particulada variando de 22% a 37% para esgoto bruto e de 12% a 28% para efluentes de ETE. Contudo, essa distribuição variou de acordo com a substância alvo, uma vez que o 17 α -etililestradiol (EE2), fármaco utilizado como contraceptivo, teve 82% e 75% da sua quantificação obtida no material particulado de afluentes e efluentes de ETE, respectivamente.

Apesar das particularidades analíticas de cada estudo e das diferentes matrizes ambientais, os resultados obtidos no presente trabalho guardam semelhança com os dados publicados por Dagnino *et al.* (2010) e Yarahmadi *et al.* (2018).

O conhecimento dos mecanismos de interação das substâncias estrogênicas com as diferentes fases de sólido (dissolvida e particulada) nas matrizes ambientais e o decorrente fracionamento são informações úteis para, além de avaliar sua ocorrência, otimizar seus processos de remoção. No caso do esgoto, a atividade estrogênica é reduzida com boa eficiência pelo tratamento biológico com lodo ativado (SVENSON *et al.*, 2003).

Não obstante, o controle das frações de sólidos suspensos remanescentes nos efluentes pode ser fundamental, uma vez que poluentes recalcitrantes à biodegradação têm a tendência a se concentrar adsorvidos nas menores partículas. Nesse sentido, em todas as ETE's avaliadas por Yarahmadi *et al.* (2018), a relação entre a concentração das partículas maiores que 0,30 μm e os SST ($\text{Ø} > 0,45 \mu\text{m}$) aumentou do afluente para o efluente, o que influi diretamente na distribuição das substâncias estrogênicas.

No presente estudo, os extratos dos sólidos suspensos com diâmetro superior a 0,70 μm contribuíram com as menores porcentagens da atividade estrogênica total. Porém, fato recorrente foi a observação da citotoxicidade no ensaio YES para estas frações. Isto é, houve a inibição do crescimento da levedura quando exposta a essas amostras, o que se traduz como ausência de turbidez ao final do ensaio.

Tal fenômeno pode ser explicado pela eventual presença de substâncias tóxicas à levedura (FRISCHE *et al.*, 2009), que acabam sendo concentradas no processo de extração da amostra. Foram obtidos valores de 16% a 87% de inibição do crescimento da levedura no poço mais concentrado de extrato de amostras. Todavia, os cálculos de atividade estrogênica não chegaram a ser inviabilizados.

CONCLUSÃO

Foram observados valores de equivalente estradiol (EQ-E2) total na faixa de 35 ng L⁻¹ a 65 ng L⁻¹, dos quais 35% a 62% estavam associados à fase particulada da amostra. A maior parte da estrogenicidade encontrou-se associada às partículas menores que 0,70 μm , enquanto que a citotoxicidade foi induzida pelos extratos das partículas superiores a 0,70 μm . Os resultados demonstraram a importância da análise das frações sólidas para a quantificação da atividade estrogênica total de matrizes ambientais aquosas, bem como a relevância do controle de sólidos suspensos finos em efluentes de estação de tratamento de esgoto, no que concerne ao controle de desreguladores endócrinos no meio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA; AWWA; WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22 ed., 1360 p., 2012.
2. AQUINO, S. F.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. Eng. Sanit. Ambient., Rio de Janeiro, v. 18, n. 3, p. 187-204, 2013.
3. 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.
4. BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. Química Nova, v. 30, p.651-66, 2007.
5. BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Process. 1ª edição. Ed.: Lewis Publishers, 295 p., 2003.

6. DAGNINO, S.; GOMEZ, E.; PICOT, B.; CAVAILLÈS, V.; CASELLAS, C.; BALAGUER, P.; FENET, H. Estrogenic and AhR activities in dissolved phase and suspended solids from wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, v. 408, p. 2608–2615, 2010.
7. DUONG, C. N.; RA, J. S.; SCHLENK, D.; KIM, S. D.; CHOI, H. K.; KIM, S. D. Sorption of Estrogens onto Different Fractions of Sediment and Its Effect on Vitellogenin Expression in Male Japanese Medaka. *Arch Environ Contam Toxicol*, v. 59, p. 147–156, 2010.
8. 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.
9. SVENSON, B.; ALLARD, A.-S.; EK, M. Removal of Estrogenicity in Swedish Municipal Sewage Treatment Plants, *Water Research*, v. 37, p. 4433–4443, 2003.
10. VEGA-MORALES, T.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRIGUEZ, J. J. Evaluation of the Presence of Endocrine-Disrupting Compounds in Dissolved and Solid Wastewater Treatment Plant Samples of Gran Canaria Island (Spain). *BioMed Research International*, v. 2013, ID 790570, 15 p., 2013.
11. WILLIAMS, R. J.; JURGENS, M. D.; JOHNSON, A. C. Initial predictions of the concentrations and distribution of 17 β -oestradiol, oestrone and ethinyl oestradiol in 3 English rivers. *Water Research*, v. 33, n. 7, p. 1663–1671, 1999.
12. YARAHMADI, H; DUY, S. V.; HACHAD, M.; DORNER, S.; SAUVÉ, S.; PRÉVOST, M. Seasonal variations of steroid hormones released by wastewater treatment plants to river water and sediments: Distribution between particulate and dissolved phases. *Science of the Total Environment*, v. 635, p. 144–155, 2018.